Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

Über die Haltbarkeit von Impfstoffen aus durch Formalin inaktivierten und vermehrungsfähigen Viren unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Romberg
aus Schwerin/Meckl.

1970

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

Über die Haltbarkeit von Impfstoffen aus durch Formalin inaktivierten und vermehrungsfähigen Viren unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Romberg
aus Schwerin/Meckl.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof.Dr.med. Georg Henneberg

2. Referent: Prof.Dr.phil. Gerhard Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1969

Tag der Promotion:

3. FEB. 1970

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Henneberg, dem Leiter des Robert Koch-Instituts Berlin. Sie wurde mit Zustimmung des Leiters des Pharmazeutischen Instituts der Freien Universität Berlin Herrn Professor Dr. G. Schenck im Robert Koch-Institut Berlin ausgeführt.

Herrn Professor Dr. G. Henneberg danke ich für die jederzeit gewährte wohlwollende Hilfe und großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Auch Herrn Dr. J. Drescher möchte ich meinen Dank für wertvolle Ratschläge zu meiner Arbeit aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	Einleitung	1
B	Problemstellung: Haltbarkeit von Impfstoffen	2
I	Definition der Haltbarkeit	2
II	Für die Haltbarkeit wichtige Eigenschaften der Impfstoffe	2
	1) Wirksamkeit	2
	2) Unschädlichkeit	2
III	Beeinflussung der Haltbarkeit	3
	1) Beeinflussung durch Substanzen im Impfstoff	3
	2) Beeinflussung durch äußere Einflüsse	8
	a) Flüssige Impfstoffe	8
	b) Lyophilisierte Impfstoffe	13
IV	Die Haltbarkeit betreffende Vorschriften	15
V	Prüfbarkeit der Haltbarkeit	18
	1) Möglichkeiten im Laboratorium	18
	2) Möglichkeiten des Apothekers	20
C	Experimenteller Teil	22
I	Gelbfieber-Impfstoff	22
	a) Material und Methoden	22
	b) Ergebnis	23
II	Poliomyelitis-Impfstoff aus inaktivierten Viren	27
	1. Versuch	27
	2. Versuch	29
	a) Material und Methoden	29
	1) Antigenitätsbestimmung	30
	2) Deshämaggregationsbestimmung	32
	b) Ergebnisse	33
	1) Antigenitätsbestimmung	33
	2) Deshämaggregationsbestimmung	38
	3) Zusammenfassung	38
	3. Versuch	40
	a) Material und Methoden	40
	1) Antigenitätsbestimmung	41
	2) Deshämaggregationsbestimmung	42

Seite

b) Ergebnisse 43

1) Antigenitätsbestimmung 43

2) Deshämaggregationsbestimmung 51

3) Zusammenfassung 52

D Zusammenfassung und Diskussion 56

E Schluß 60

F Literaturangaben 62

A Einleitung

Gemäß dem Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG) sind Impfstoffe "Arzneimittel, die Antigene enthalten und die dazu bestimmt sind, bei Menschen oder Tieren zur Erzeugung von spezifischen Abwehr- und Schutzstoffen angewandt zu werden" (1).

Auf Grund ihrer Zusammensetzung unterscheidet man:

1) Impfstoffe mit vermehrungsfähigen Mikroorganismen
2) Impfstoffe mit inaktivierten, d.h. nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen

und 3) Impfstoffe mit entgifteten Toxinen, sogenannten Toxoiden.

Handelt es sich bei den Mikroorganismen um Viren, so spricht man von Virus-Impfstoffen.

Nach ihrer Herstellungsart unterscheidet man die gebrauchsfertigen flüssigen Impfstoffe und die gefriergetrockneten Impfstoffe, die vor ihrer Verwendung aufgeschwemmt werden müssen. Falls nicht besonders hervorgehoben, ist im folgenden von flüssigen Impfstoffen die Rede.

Beide haben eine, wenn auch unterschiedlich lange, begrenzte Haltbarkeit.

B Problemstellung: Haltbarkeit von Impfstoffen

I Definition der Haltbarkeit

Unter Haltbarkeit soll verstanden werden, daß ein Impfstoff seine für die Impfung und Immunisierung erforderlichen Eigenschaften innerhalb einer bestimmten Zeit nicht verändert; diese Eigenschaften sind vor allem die Wirksamkeit und die Unschädlichkeit eines Impfstoffes.

II Für die Haltbarkeit wichtige Eigenschaften der Impfstoffe

1. Wirksamkeit

Ein Impfstoff wird als wirksam bezeichnet, wenn er nach Einverleibung den Organismus durch Ausbildung der Immunität in die Lage setzt, entweder nach einer Infektion das Ansiedeln und damit die Vermehrung von Krankheitserregern zu verhindern, oder wenn dies nicht möglich ist, die Mikroorganismen nach Eintruch in die Blutbahn mit Hilfe spezifischer Antikörper zu neutralisieren.

Zur Verhütung von Krankheiten, die durch verschiedene Typen eines Erregers hervorgerufen werden können, ist es wichtig, daß der Impfstoff jeweils die typenspezifischen Antigene enthält. So z.B. bei dem Poliomyelitis-Impfstoff drei verschiedene Poliomyelitis-Virustypen oder beim Grippe-Impfstoff Stämme der Typen A und B.

2. Unschädlichkeit

Ein Impfstoff wird als unschädlich bezeichnet, wenn er beim Geimpften keinen Schaden in Form einer starken lokalen Reaktion oder einer Allgemeinerkrankung erzeugt. Das Antigen muß unschädlich sein, es darf nicht allergisieren. (So stellte sich heraus, daß der Impfstoff aus inaktivierten Masernviren allergische Erscheinungen bei den Geimpften hervorruft, wenn sie mit dem Masernvirus erneut in Kontakt kommen (2)).

Auch durch Überdosierung eines Antigens kann ein Impfstoff schädlich werden (3).

Da die meisten Impfstoffe Antigen-Mindestmengen enthalten, ist die Wahrscheinlichkeit größer, daß ein Schaden durch Unterdosierung in Form von Unwirksamkeit auftritt: Ein Geimpfter könnte sich im Vertrauen auf den scheinbar erzeugten Impfschutz einer Infektion aussetzen, sich infizieren und erheblich Schaden nehmen.

Das Antigen muß auch genetisch stabil sein. So muß die Virulenz der Impfstoffviren auch nach Passage durch den Geimpften irreversibel abgeschwächt bleiben.

Zum anderen darf der Impfstoff außer dem deklarierten Antigen keine anderen Keime, Fremdkeime, enthalten, die nicht in den Impfstoff gehören, aber beim Herstellungsprozeß hineingelangten. Impfstoffe aus inaktivierten Viren dürfen keine vermehrungsfähigen Viren enthalten.

Außerdem sollte ein Impfstoff frei sein von allergisierenden Zusatzstoffen; dazu sollte auch Penicillin gehören.

Das Bestreben zielt jedoch nicht nur dahin, einen wirksamen und unschädlichen Impfstoff herzustellen, sondern, diese Qualitäten möglichst lange zu erhalten. Das bedeutet, daß Faktoren auszuschalten sind, die die Haltbarkeit ungünstig beeinflussen, bzw. daß Sicherungen einzubauen sind, die die Haltbarkeit stabilisieren. Solche Faktoren ergeben sich auf Grund der Impfstoffzusammensetzung oder sie wirken von außen ein, wie z.B. Material des Gefäßes, Licht und Temperatur.

III Beeinflussung der Haltbarkeit

1. Haltbarkeitsbeeinflussung durch Substanzen im Impfstoff

Das Antigen: Die Wahl geeigneter Antigene in Bezug auf die gegenseitige Haltbarkeitsbeeinflussung ist vor allem für die Herstellung von Mischimpfstoffen von Bedeutung. So stellte man neben einer gegenseitigen Wirksamkeitssteigerung in Toxoidgemischen (Diphtherie-Tetanus-Impfstoff) eine schädi-

gende Wirkung der Viruskomponente im Diphtherie-Pertussis-Tetanus-Poliomyelitis-Impfstoff auf den Pertussisanteil fest. Veröffentlichungen aus neuerer Zeit machen jedoch nicht die Antigene selbst, sondern Begleitstoffe dafür verantwortlich (siehe unten).

Das Suspensionsmittel: Ein für sämtliche Impfstoffe optimales Suspensionsmittel gibt es nicht. Für jeden Impfstoff mußte das geeignete herausgefunden werden. So werden z.B. für Influenza- und Tollwut-Impfstoffe phosphatgepufferte NaCl-Lösungen - wenn auch verschiedener Konzentrationen (0,12% bis 0,15% bzw. 0,9%) - als Suspensionsmittel benutzt (4,5), ein Medium, das für den flüssigen BCG-Impfstoff ungeeignet ist (6). Für ihn mussen der physiologischen Kochsalzlösung 0,5% Gelatine, 5% Glukose und 5% Laktose zugesetzt werden (6); günstiger ist jedoch eine 1:4 verdünnte Sauton-Lösung (6).

Beim Poliomyelitis-Impfstoff stellt die zur Viruszüchtung benötigte Nährlösung, Parker-Medium oder Medium 199 (7), das Suspensionsmittel dar. Dies ist eine Lösung aus 21 Aminosäuren, 17 Vitaminen und vitaminähnlichen Verbindungen, 9 Nukleinsäurebausteinen u.a.m.

Das Vaccinia-Virus für die Pockenimpfung ist in einer Glyzerin-Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Das Glyzerin soll nach Dostal (9) den Vorteil haben, daß es noch bei Temperaturen von +4°C bis +10°C bakterizid wirkt, so daß bakterielle Verunreinigungen abgetötet werden. Nachteilig sei jedoch, daß mit steigender Temperatur auch die viruzide Wirkung zunimmt. Zwar macht sie sich nach Dostal bei Temperaturen zwischen -10°C und -20°C praktisch nicht bemerkbar und wird bei Temperaturen zwischen 0°C und +4°C durch den bakteriziden Effekt bei weitem übertroffen, doch schon Temperaturen ab +10°C lassen den Impfstoff dadurch instabil werden.

Adjuvantien: Den Impfstoffen können zur Verstärkung der antigenen Wirksamkeit Adjuvantien zugesetzt werden, wie z.B. Mineralöle, Aluminiumhydroxid und -oxid. Auf Grund der Eigenschaften dieser Stoffe, Eiweißsubstanzen, Mikroorganismen u.a.

zu adsorbieren, und des Vermögens, an der Injektionsstelle ein Antigendepot zu setzen, werden solche Impfstoffe als Adsorbat- bzw. Depot-Impfstoffe bezeichnet. Ihre antigene Wirksamkeit ist z.B. 2/3 mal (Pertussis-Impfstoff) bis über 70 mal (Tetanus-Impfstoff) so groß wie bei den entsprechenden adsorbensfreien Impfstoffen (10). Neben dieser antigenitätssteigernden Wirkung üben die Adjuvantien einen günstigen Einfluß auf die Impfstoffhaltbarkeit aus. Dies berichteten z.B. Hahn et al. in ihrer Arbeit über Poliomyelitis-Impfstoffe (11).

Konservierungsmittel: Konservierungsmittel sollen das Wachstum von Bakterien und Pilzen im Impfstoff verhindern, ohne das Antigen zu schädigen. Auf Grund der unterschiedlichen Natur und Aufbereitungsweise der Impfstoffantigene werden verschiedene Konservierungsmittel verwendet. Am gebräuchlichsten sind neben den Antibiotika Formalin, Quecksilberpräparate, quartäre Ammonium-Verbindungen und Phenol. Zum Teil sind sie im Impfstoff enthalten, bedingt durch die Antigenherstellung, zum Teil werden sie direkt zugesetzt. Zur ersten Gruppe gehören die Spuren an Penicillin (jedoch s.o.) und Streptomycin, die aus den Zellkulturen zur Poliomyelitis-Viruszüchtung stammen und mit der Virussuspension in den Impfstoff gelangen.

Auch freier Formaldehyd kann in denjenigen Impfstoffen enthalten sein, deren Antigen durch Formaldehyd inaktiviert wird. Jedoch sind Höchstmengen vorgeschrieben (z.B. darf der Tetanus-Impfstoff nur bis zu 0,02% freien Formaldehyd enthalten (10)), da Formaldehyd in hoher Konzentration die Antigenität zerstört.

Zu den Konservierungsmitteln, die den Impfstoffen direkt zugesetzt werden, gehören auch Antibiotika, z.B. möglicherweise auch Penicillin (jedoch s.o.) und Streptomycin beim Pocken-Impfstoff. Der Versuch, diese Stoffe durch Aureomycin zu ersetzen, schlug fehl, da das Aureomycin viruzide Eigenschaften zeigte (12).

Quartäre Ammonium-Verbindungen verstärken die antibakterielle Wirkung der Restantibiotika kaum, wohl aber die antimykotische (13). Ihr Einfluß auf die Impfstoffantigenität wurde von Arro

an Poliomyelitis-Impfstoffen untersucht (14). Wurden die Impfstoffe bei +4°C gelagert, konnte auch nach 59 Wochen keine Antigenitätsschädigung nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den Impfstoffen, die ebensolange bei +32°C lagerten. Demgegenüber wiesen Olson (15) und Pontecorvo (16) nach, daß Benzethoniumchlorid das Pertussisantigen schädigt, ein Effekt, der nach Olson durch $AlK(SO_4)_2$ zu 70% aufgehoben wird. Zu beachten ist, daß oberflächenaktive Stoffe, wie z.B. Tween 80 die Wirkung vieler Konservierungsmittel aufheben können; z.B. inaktiviert ein Zusatz von 1% Tween 80 95% Cetylpyridiniumchlorid, bzw. 0,1% noch 60% (17).

Es werden auch Konservierungsmittel aus der Reihe organischer Quecksilber-Verbindungen verwendet (18a-f), deren bekannteste Vertreter das Merthiolat (Na-Salz der Aethyl-mercuri-mercapto-salizylsäure) und Thiocid (p-Aethyl-mercuri-mercapto-benzol-sulfonat-Na) sind. Bei Poliomyelitis-Impfstoffen aus inaktivierten Viren ist die Quecksilberkonzentration auf 0,0625 mg/ml begrenzt. Nachteilig machte sich bei diesen Verbindungen bemerkbar, daß sie leicht durch Cu^{++} und andere zweiwertige Metallionen abgebaut werden (19). Jedoch verhindert dies der Zusatz eines Komplexbildners, z.B. Versen (Tri-Na-Salz der Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA)).

Pontecorvo fand, daß Merthiolat zusammen mit EDTA im Mischimpfstoff die Pertussiskomponente stark schädigt; im Gegensatz zum Merthiolatzusatz allein, der den Pertussisanteil schützt, sich aber nachteilig auf das Poliomyelitis-Antigen auswirkt (16).

Über die Beziehung zwischen Thimerosal (= Merthiolat) und dem Material des Stopfens siehe weiter unten.

Phenol wird als Konservierungsmittel in Konzentrationen von 0,3% bis 1% verwendet, und zwar in Impfstoffen gegen Cholera 0,3% bis 0,5% (18g,20) und gegen Tollwut 0,5% bis 1% (18h,i). Nach Banič jedoch sollte ein Tollwut-Impfstoff mit 10% und weniger Hirnsubstanz nicht mehr als 0,5% Phenol enthalten, da höhere Phenolkonzentrationen die Antigenität nachteilig beeinflussen (22).

Auch im Influenza-Impfstoff aus vermehrungsfähigen Viren können 0,5% Phenol als Konservierungsmittel enthalten sein (21), obwohl Potel und Hlawatsch zeigen konnten, daß eine phenolisierte Virussuspension nach 5monatiger Lagerung nicht mehr infektiös war (24).

Als Konservierungsmittel werden auch die Methyl- und Propylester der p-Hydroxybenzoesäure verwendet. Allerdings führten sie in Poliomyelitis-Mischimpfstoffen zum vollständigen Wirksamkeitsverlust des Pertussisanteils (16).

Stabilisatoren: Stabilisatoren sind Stoffe, die den Impfstoffen zum Schutz des Antigens zugesetzt werden. Die Aluminium-Verbindungen der Adsorbat-Impfstoffe rechnet man, obwohl sie die Haltbarkeit verlängern, nicht hierzu, da bei ihnen die Wirksamkeitssteigerung im Vordergrund steht. Dagegen gehören hierher der 1molare $MgCl_2$-Zusatz zu den Poliomyelitis-Impfstoffen aus vermehrungsfähigen Viren, der es ermöglicht, daß diese Impfstoffe über 3 Wochen bei Zimmertemperatur ohne Wirksamkeitseinbuße gelagert werden können, und ebenso der Polyvinylpyrrolidon- oder Pepton-Zusatz zum flüssigen Pocken-Impfstoff (23). Zu den Stabilisatoren müssen auch die Verbindungen gezählt werden, die den gefriergetrockneten Impfstoffen zu Beginn der Herstellung zugesetzt werden, wie z.B. Glukose (25) oder Laktose (27) bzw. Rohrzucker und Gelatine (25) beim BCG-Impfstoff und Pepton (26) zum Pocken-Impfstoff.

Neben den aufgezählten Komponenten kann die Impfstoffhaltbarkeit auch durch Stoffe beeinflußt werden, die nicht klar zu definieren sind. Beispielsweise bildet im Falle des Poliomyelitis-Impfstoffes die von den Zellen der Gewebekultur abfiltrierte virushaltige Nährlösung mitsamt der in ihr gelösten Zellbestandteile die Impfstoffsuspension. Auf ihren Gehalt an "fermentähnlichen Stoffen" führten Beale und Ungar die verminderte Haltbarkeit des Pertussisanteils in Poliomyelitis-Mischimpfstoffen zurück, da der Effekt durch den Zusatz von Fermentblockern zu verhindern war (28).

Bekannt ist auch die durch Fermente hervorgerufene Autolyse

in den Typhus- und Cholera-Impfstoffen. Evangelinos und Wohlfeil (29) beobachteten, daß sich nach längerem Lagern die ursprünglich trüben Suspensionen klärten und mit der Impfstoffklärung eine Abnahme der Wirksamkeit einherging.

2. Haltbarkeitsbeeinflussung durch äußere Einflüsse

a) Haltbarkeit von flüssigen Impfstoffen:

Impfstoffbehälter: Wie wichtig die Wahl geeigneter Impfstoffbehälter ist, zeigten Bonin et al. (30). Sie wiesen an einem Impfstoff aus vermehrungsfähigen Poliomyelitis-Viren aller drei Typen nach, daß von der Glaswand des Impfstoffbehälters die Viren des Typs 1 so stark adsorbiert wurden, daß in der Impfstoffsuspension nur noch ca. 10% der ursprünglichen Menge enthalten waren. Dagegen war die Adsorption von Viren der Typen 2 und 3 unbedeutend. Mechanisches Schütteln konnte die Adsorption nicht aufheben. Nur durch Zusatz geringfügiger Serummengen zum Impfstoff oder durch Silikonbedampfung der Gefäße vor ihrer Füllung ließ sich dieser unerwartete Vorgang vermeiden. Von einer Adsorption an Glas berichteten 1961 schon Weihl et al. (31). Allerdings handelte es sich hierbei um einen Poliomyelitis-Impfstoff aus inaktivierten Viren in physiologischer Salzlösung; und betroffen waren besonders die Typen 2 und 3. In einem Vergleichsimpfstoff mit Parker-Medium als Suspensionsmittel trat diese Adsorption nicht auf. Die Autoren führten dies auf den Tween 80-Anteil (20γ/ml) im Suspensionsmittel zurück.

Auch auf die Art des Behälterverschlusses ist zu achten; denn schwefelhaltige Gummistopfen können bestimmte Konservierungsmittel inaktivieren. Birner und Garnet (33) berichteten z.B., daß in 1 ml-Behältern das quecksilberhaltige Konservierungsmittel Thimerosal nach 22 Wochen Lagerung nicht mehr nachzuweisen war.

Licht und UV-Strahlen: Bestimmte Impfstoffe, so Impfstoffe aus vermehrungsfähigen Mikroorganismen, sind gegen Licht und UV-Strahlen besonders empfindlich; z.B. die Pockenlymphe, die

schon durch diffuses Tageslicht allmählich geschädigt wird (32).

Den flüssigen BCG-Impfstoff setzte Rosenthal (52) 40 Minuten direktem Sonnenlicht (+13°C bis +36°C) oder 120 Minuten indirektem Sonnenlicht (+9°C bis +18°C) aus. Anschließend konnte er keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr feststellen. Dagegen gewährten braun gefärbte Ampullen vollen Schutz.

Temperatur: In der Regel wirkt sich der Temperatureinfluß stärker auf Virus-Impfstoffe aus als auf Bakterien-Impfstoffe. Während eine Reihe von Bakterien-Impfstoffen bei Temperaturen bis zu +15°C zwischen 2 und 10 Jahren wirksam ist, sind viele Virus-Impfstoffe bei Temperaturen bis zu +5°C nur 1 bis 2 Jahre haltbar; siehe Tabelle 1:

Impfstoffhaltbarkeit bei „kühler" Lagerung

Impfstoff		Temperatur	Dauer der Wirksamkeit	Literatur
Bakterien-Impfstoffe	Cholera -	„kühl"	2 Jahre	Joó ⟨34⟩
	TAB -	„Kühl"	„einige" Jahre	Schäfer ⟨35⟩
	Diphtherie -	+4°C	mindest. 5 Jahre	v. Ramshorst Ehrengut ⟨36⟩
	Pertussis -	+4°C bis +10°C	5 bis 8 Jahre	Hansen ⟨10⟩
	Tetanus -	„Kühl"	mindest. 10 Jahre	Regamey ⟨37⟩
Virus-Impfstoffe	Tollwut -	+4°C	1 Jahr	Gildemeister ⟨38⟩
	Masern - (inakt.)	+5°C	mind. 1 Jahr	Spiess Enders-Ruckle ⟨39⟩
	Influenza -	im Kühlschrank	ca. 2 Jahre	Vivell ⟨40⟩
	Poliomyelitis - (inakt.)	+4°C	mind. 2 Jahre	Körner Hennessen ⟨41⟩

Tabelle 1

Besonders empfindlich sind der flüssige BCG- und der flüssige Pocken-Impfstoff; siehe folgende Tabelle 2:

Haltbarkeit des flüssigen BCG- und des flüssigen Pocken-Impfstoffes			
Impfstoff	Temperatur	Dauer der Wirksamkeit	Literatur
BCG -	+4°C	14 Tage 4 Wochen	Spiess ⟨42⟩ Rosenthal ⟨43⟩
Pocken -	+5°C im Kühlschrank unter 0°C	4 Monate 4 Wochen 4 Wochen	Fisek ⟨44⟩ Posch ⟨45⟩ Dostal/Lorenz ⟨23⟩

Tabelle 2

Bei höheren Temperaturen verkürzt sich die Haltbarkeitsdauer der Impfstoffe, wie es die folgende Tabelle 3 an drei Beispielen zeigt:

Verminderte Impfstoffhaltbarkeit bei höheren Temperaturen

Impfstoff	Temperatur	Dauer der Wirksamkeit	Literatur
Pertussis –	+4°C bis +10°C ca. +20°C +37°C	5 bis 8 Jahre 21 Monate 6 Monate	Hansen ⟨10⟩
Poliomyelitis – ⟨vermehrungsfähige Viren, stabilisiert durch $MgCl_2$⟩	+4°C +25°C bis +28°C +50°C	150 Tage 3 Wochen 2 Stunden	Hahn et al. ⟨46⟩ Melnick et al. ⟨47⟩ Melnick et al. ⟨48⟩
flüssiger Pocken –	bis + 4°C ab +10°C ab +30°C	1–4 Monate wenige Tage wenige Stunden	siehe Tab. 2 Dostal ⟨9⟩

Tabelle 3

Auch auf Poliomyelitis-Impfstoff aus inaktivierten Viren wirken sich höhere Temperaturen ungünstig aus, wie die folgende Tabelle 4 zeigt:

Temperatur Höhe	Temperatur Dauer	Wirksamkeitsbeeinflussung	Literatur
+ 4°C	2 Jahre	Impfstoff wirksam	siehe Tab. 1
+21°C	40 Tage	Typ 2 und 3 : wirksam Typ 1 : gering wirksam	Perkins, Yetts ⟨49⟩
+24°C	60 Tage	Typ 2 und 3 : ca. 35% Restwirksamkeit Typ 1 : ca. 20% "	de Somer et al. ⟨50⟩
+31°C	40 Tage	Typ 1 unwirksam Typ 2 wirksam Typ 3 gering wirksam	Perkins, Yetts ⟨49⟩
	100 Tage	Typ 1, 2 und 3 unwirksam	
+37°C	35 Tage	Typ 1 : ca. 10% Restwirksamkeit Typ 2 : ca. 25% " Typ 3 : ca. 20% "	de Somer et al. ⟨50⟩
+45°C	30 Minuten	Typ 1 und 2 wirksam	Powell, Culbertson ⟨51⟩
+50°C	30 Minuten	Typ 1 gering wirksam Typ 2 wirksam	Typ 3 nicht geprüft
+55°C	30 Minuten	Typ 1 und 2 unwirksam	

Einfluß verschiedener Temperaturen
auf die Wirksamkeit von Poliomyelitis-Impfstoffen aus inaktivierten Viren

Tabelle 4

b) Haltbarkeit von lyophilisierten Impfstoffen:

Lyophilisierte Impfstoffe sind mittels der Gefriertrocknungstechnik hergestellte Impfstoffe, die sich in einem geeigneten Medium leicht resuspendieren lassen.

Der Gefriertrocknungsprozeß umfaßt für das zu behandelnde Gut zwei einschneidende Vorgänge: das Tieffrieren der Antigensuspension, u.U. mit Stabilisatorzusatz, und den Trocknungsprozeß durch das Sublimieren des Eises. Wenn sich aus einem Virus, wie z.B. dem Poliomyelitis-Virus, z.Zt. kein brauchbarer Trockenimpfstoff herstellen läßt, kann dies daran liegen, daß u.a. entweder die Stabilisatorlösung ungeeignet war oder daß beim Tiefkühlprozeß zu rasch oder zu langsam zu tiefe oder nicht genügend tiefe Temperaturen erreicht wurden oder daß das Antigen beim Sublimationsprozeß geschädigt wurde, ev. durch zu hohe Temperaturen. Hieraus läßt sich erkennen, wie schwierig es ist, die für jedes Antigen geeigneten Bedingungen bei der Gefriertrocknung zu bestimmen. Als gelöst gilt das Problem der Gefriertrocknung für die Herstellung des BCG-Impfstoffes, der Impfstoffe gegen Gelbfieber und Pocken und, bedingt, gegen Influenza.

Impfstoffbehälter: Über die Haltbarkeitsbeeinflussung durch Impfstoffbehälter wurde in der Literatur nicht berichtet.

Licht und UV-Strahlen: Die lyophilisierten Impfstoffe sind lichtempfindlich, besonders nach ihrer Resuspendierung zum Gebrauch. So muß z.B. der resuspendierte BCG-Impfstoff vor direktem Sonnenlicht geschützt werden (18 1).

Feuchtigkeit: Im Gegensatz zu den flüssigen Impfstoffen spielt die Feuchtigkeit bei den lyophilisierten Impfstoffen eine Rolle. Wie bei allen gefriergetrockneten Substanzen soll der Restfeuchtigkeitsgehalt nicht mehr als 5% betragen(32). Der BCG-Trockenimpfstoff muß einen Restfeuchtigkeitsgehalt zwischen 1% und 3% besitzen, da sich schon 4% nachteilig auf seine Haltbarkeit auswirken (52). Für die lyophilisierten Impfstoffe gegen Pocken und Gelbfieber werden sogar Restfeuchtigkeitswerte von weniger als 1% ange-

strebt (53,54).

Im gebrauchsfertigen Zustand sind die lyophilisierten Impfstoffe nur kurze Zeit haltbar. Der BCG-Impfstoff, der gebrauchsfertig am gleichen Tag verwendet werden muß (18 1), ist relativ lange haltbar, verglichen mit dem Gelbfieber-Impfstoff, der innerhalb 1/2 Stunde (58), und einem Masern-Impfstoff, der sofort (18m) verbraucht werden soll.

Temperatur: Der Temperatureinfluß, der für die Haltbarkeit flüssiger Impfstoffe eine große Rolle spielt, wird zwar durch die Einführung gefriergetrockneter Impfstoffe nicht beseitigt, aber stark gemindert. Die Tabelle 5 zeigt dies am Beispiel des BCG-Impfstoffes und des Pocken-Impfstoffes.

Haltbarkeits-Vergleich

Flüssiger Impfstoff — Trocken-Impfstoff

Impfstoff \ Temperatur (°C)		+4°	+22°	+37°	+45°	+60°
BCG-	Flüssig	10 Tage [1] 14 Tage [2]	/	/	/	/
	Trocken	1 Jahr [3] 2 Jahre [4]	/	1 Monat [4]	/	5 Minuten [5]
Pocken-	Flüssig	12 Wochen [6]	/	/	/	/
	Trocken	/	1 Jahr [7]	4 Monate [7]	2 Monate [8]	/

[1] Eissner (56)
[2] Spiess (42)
[3] Handels-Impfstoff (181)
[4] Ebina und Kayaba (55)
[5] Ebina et al. (6)
[6] Verwaltungsvorschr. d. Bundesländer (8)
[7] Collier (26)
[8] Munz (32)

Tabelle 5

Der Vorteil gefriergetrockneter Impfstoffe gegenüber flüssigen Impfstoffen besteht nicht nur darin, daß sie bei niedrigen Temperaturen bedeutend länger haltbar sind, sondern daß sie auch begrenzte Zeit höheren Temperaturen ausgesetzt sein können, ohne an Wirksamkeit zu verlieren. Trotzdem wird empfohlen, diese Impfstoffe bei längerer Lagerung im Kühlschrank oder in der Tiefkühltruhe aufzubewahren.

IV Die Haltbarkeit betreffende Vorschriften

Impfstoffe gehören zu den Arzneispezialitäten mit zeitlich beschränkter Haltbarkeit und müssen auf Grund des § 9 des AMG ein Verfalldatum tragen. Dieses Verfalldatum zeigt nicht die tatsächliche Haltbarkeitsdauer eines Impfstoffes an. Es begrenzt einen Mindestzeitraum, innerhalb dessen der Hersteller für die Wirksamkeit und Unschädlichkeit des Impfstoffes garantiert. Voraussetzung ist eine sachgemäße Impfstoffbehandlung, z.B. Einhalten bestimmter Lagerungstemperaturen. Impfstoffe, deren Verfalldatum abgelaufen ist, dürfen nicht zum Verkauf vorrätig gehalten, feilgehalten, verkauft oder sonst in den Verkehr gebracht werden (§ 8 AMG).

Zur zusätzlichen Sicherheit werden die Impfstoffe staatlich überwacht. Das geschieht einmal vor dem Inverkehrbringen als Zweitprüfung neben der des Herstellers, zum anderen als routinemäßige Überprüfung an einbehaltenen Proben. Erweist sich dabei ein Impfstoff vor dem Erreichen seines Verfalldatums als unwirksam oder schädlich, wird die gesamte Charge durch öffentliche Bekanntmachung aus dem Verkehr gezogen.

Art und Dauer der Lagerung von Impfstoffen sind zum Teil gesetzlich geregelt. Hierzu gehören die Vorschriften über den Pocken-Impfstoff (8) und über die Poliomyelitis-Impfstoffe (57a,b).

Der Pocken-Impfstoff ist gemäß der Verordnung zur Ausführung des Impfgesetzes und der Verwaltungsvorschriften der Bundesländer vor Licht geschützt bei Temperaturen bis zu höchstens +4°C aufzubewahren und innerhalb eines Vierteljahres nach der Abgabe aus der Impfanstalt zu verwenden. Lagert er bei

Art und Dauer der Lagerung von Handels-Impfstoffen			
Impfstoff	Art der Lagerung	Dauer der Lagerung	Grund der Vorschrift
Bakterien-Impfstoffe			
Diphtherie –	Kühl, aber frostfrei	5 Jahre	Herstellerangaben ⟨18a⟩
Tetanus –	Kühl, aber frostfrei	5 Jahre	Herstellerangaben ⟨18c⟩
Pertussis –	+4°C bis +6°C	5 Jahre	Herstellerangaben ⟨18b⟩
TAB –	Kühl, aber frostfrei	3 Jahre	Herstellerangaben ⟨18a⟩
BCG – Flüssig	+4°C	14 Tage	Herstellerangaben ⟨18k⟩
Trocken	+4°C bis +6°C	12 Monate	Herstellerangaben ⟨18l⟩
Virus-Impfstoffe			
Tollwut –	+4°C bis +6°C	1 Jahr	Herstellerangaben ⟨18i⟩
Poliomyelitis – mit inaktivierten Viren	+4°C bis +6°C	1 Jahr	Ministererlaß ⟨57a⟩
Poliomyelitis – mit vermehrungsfähigen Viren:			
flüssig, ohne Stabilisator	ununterbrochene Kühlung,	7 Tage	Ministererlaß ⟨57b⟩
test, mit Stabilisator		3 Monate	
flüssig, mit Stabilisator	(t. Herstellerangaben)	6 Monate	
Influenza –	+4°C bis +6°C	1½ bzw. 2 Jahre	Herstellerangaben ⟨18f, 21⟩
Masern – mit vermehrungsfähigen Viren	+4°C bis +6°C	6 Monate	Herstellerangaben ⟨18m⟩
Pocken – „flüssig"	bis +4°C	3 Monate	Verwaltgs.-Vorschr. ⟨8⟩
Gelbfieber –	unter +4°C	1 Jahr	Empfehlung d. WHO ⟨61,62⟩

Tabelle 6

Temperaturen über +4°C, muß er innerhalb von 24 Stunden verbraucht werden (8).

Die Lagerungszeit des Poliomyelitis-Impfstoffes richtet sich nach seiner Art und Zusammensetzung:

1) Der Impfstoff aus inaktivierten Viren ist ein Jahr lang zum Verkehr zugelassen.

2) Der Impfstoff aus vermehrungsfähigen Viren darf

   a) in fester Form unter Stabilisatorzusatz bis zum Ablauf des 3. Monats nach der Auslieferung
   b) in flüssiger Form unter Stabilisatorzusatz bis zum Ablauf des 6. Monats nach der Auslieferung
   c) in flüssiger Form ohne Stabilisatorzusatz bis zum 7. Tag nach dem Auftauen

   verwendet werden. Dies gilt nur unter der Bedingung, daß der Impfstoff "bei ununterbrochener, geeigneter, den Anweisungen des Herstellers entsprechender Kühlung" aufbewahrt wird.

Für eine sachgemäße Aufbewahrung der Impfstoffe in der Apotheke ist seit dem 1. Januar 1969 das Deutsche Arzneibuch (DAB) 7 maßgebend. Es fordert unter "Sera und Impfstoffe": Sera und Impfstoffe sind vor Licht geschützt zwischen +4°C und +8°C aufzubewahren, sofern nicht Sondervorschriften, z.B. für Lebend-Impfstoffe, zu beachten sind (59). Das bedeutet, daß in jedem Falle die Herstelleranweisungen einzuhalten sind. Diese Anweisungen haben auf Grund der "Vorschriften über Impfstoffe und Sera" (60) allen staatlich zu prüfenden Impfstoffen beizuliegen. Als Regel gilt für Bakterien-Impfstoffe: Lagerung kühl, aber frostfrei, Laufzeit 5 Jahre; und für Virus-Impfstoffe: Lagerung zwischen +4°C und +6°C, Laufzeit 1 Jahr (63). Einzelheiten zeigt die Tabelle 6.

Die Angaben beim Gelbfieber-Impfstoff entsprechen den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (61,62), nämlich den Impfstoff bei -25°C und nach der Abgabe unter +4°C zu lagern.

Auffällig ist die für einen Bakterien-Impfstoff kurze Halt-

barkeit des BCG-Impfstoffes. Sie ist darauf zurückzuführen, daß er als einziger Bakterien-Impfstoff vermehrungsfähige Keime enthalten muß.

V Prüfbarkeit der Haltbarkeit

1. Möglichkeiten im Laboratorium:

Die Prüfung eines Impfstoffes auf seine Haltbarkeit besteht aus einer Wirksamkeitsprüfung, wie sie im Rahmen jeder Impfstoffherstellung durchgeführt werden muß, weil sich herausgestellt hatte, daß gleiche Antigenmengen nicht gleiche Wirksamkeit zu entfalten brauchen.

Z.B. kann die Wirksamkeit von Pertussis-Impfstoffen trotz gleicher Keimzahl um den Faktor 4 schwanken (10). Auch das Vermögen des Antigens der Toxoid-Impfstoffe, Antitoxin zu binden (Angabe als Lf-Wert = Limes Flockung = diejenige Antigenmenge, die mit einer Antitoxineinheit eine optimale Agglutination ergibt) sagt nach Prigge (64) nichts über die Wirksamkeit der Impfstoffe aus, da bei unterschiedlicher Aufbereitung unterschiedlich wirksame Impfstoffe entstehen.

Je nach Art der Wirksamkeitsprüfung bestimmt man die Schutzkraft eines Impfstoffes gegenüber einer Infektion, das Infektionsvermögen seiner Mikroorganismen oder seine Antigenität.

So werden z.B. für die Diphtherie- und Tetanus-Impfstoffe Mäuse mit verschiedenen Verdünnungen eines zu prüfenden Impfstoffes immunisiert und nach bestimmtem Zeitabstand mit spezifischen Erregern in bekannter Dosis infiziert. Durch Vergleich der Überlebensrate der geimpften Tiere und einer ungeimpften Kontrollgruppe lassen sich die Schutzeinheiten (SE) der Impfstoffe bestimmen.

Beim Gelbfieber-Impfstoff handelt es sich um einen Impfstoff aus vermehrungsfähigen, für den Menschen apathogenen, für die Maus aber pathogenen Viren. Hierbei wird die Wirksamkeit des Impfstoffes, ausgedrückt als Anzahl LD_{50} (die für 50% der Mäuse letale Dosis), auf Grund der Sterberate

der mit verschiedenen Impfstoffverdünnungen geimpften Mäusegruppen berechnet.

Beim Impfstoff aus vermehrungsfähigen Poliomyelitis-Viren wird wie beim Gelbfieber-Impfstoff das Infektionsvermögen seiner Keime bestimmt, allerdings in der Gewebekultur. Es wird festgestellt, welche Virusverdünnung 50% der infizierten Gewebekulturen zerstört. Die Wirksamkeit des Impfstoffes wird durch die Anzahl Gewebekulturinfektionsdosen ($GKID_{50}$) angegeben.

Eine Antigenitätsbestimmung besteht darin, Tiere zu immunisieren und nach festgelegter Zeit die gebildete Antikörperkonzentration im Serum zu bestimmen. Das geschieht, indem man verschiedene Serumverdünnungen mit einer bestimmten Infektionsdosis entsprechender Mikroorganismen mischt und anschließend im Brutei oder in der Gewebekultur prüft, ob die Infektionsdosis durch die Antikörpermenge neutralisiert wurde. Diejenige Serumverdünnung, die gerade noch die Infektionsdosis neutralisiert, wird dann als Serumtiter bezeichnet, der Test als Neutralisationstest.

Mit Hilfe der Ergebnisse des Neutralisationstestes läßt sich diejenige Impfstoffverdünnung berechnen, die 50% der geimpften Tiere veranlaßt hat, Antikörper zu produzieren. Diese Impfstoffverdünnung wird als d_{50} bezeichnet und ist ein Maß für die Impfstoffwirksamkeit. Denn je größer die d_{50} ist, desto stärker ist die Verdünnung des Impfstoffes und damit seine Wirksamkeit.

Aus dem Geschilderten erkennt man, daß zur Wirksamkeitsbestimmung von Impfstoffen Prüfungen an Gewebekulturen und vor allem Tierversuche durchgeführt werden müssen. Daraus geht die Bedeutung hervor, die der Tierversuch für die Impfstoffprüfung besitzt. Erst der Tierversuch bestätigt die Qualität eines Antigens (37,65). Zur Stützung der mit den o.a. Methoden erhaltenen Ergebnisse können weitere Bestimmungen durchgeführt werden, z.B. eine Hämagglutinations- oder eine Deshämaggregationsbestimmung.

Bei der Hämagglutinationsbestimmung z.B. von Influenza-Viren (66) wird die Fähigkeit der Viren, Erythrozyten zu

agglutinieren, gemessen, bei der Desh\u00e4maggregationsbestimmung z.B. von Poliomyelitis-Viren (67) die F\u00e4higkeit der Viren, Erythrozyten an einer Aggregation zu hindern. Während jedoch auf Grund von Beziehungen zwischen Hämagglutinationstiter und Antigenität die Hämagglutinationsbestimmung als Wirksamkeitsprüfung angesehen werden kann, ist der Deshämaggregationstiter als Maß für die Virusmenge aufzufassen.

2. Möglichkeiten des Apothekers:

Für den Pharmazeuten in der Apotheke sind demgegenüber die Möglichkeiten recht gering, festzustellen, ob ein Impfstoff noch haltbar ist.

In erster Linie ist für ihn zur Beurteilung von Arzneimitteln das Deutsche Arzneibuch zuständig. Da das DAB 7 aber keine Wertbestimmungen für Impfstoffe enthält, sollte der Apotheker dafür sorgen, daß die Voraussetzungen zum Schutze der Impfstoffhaltbarkeit erfüllt werden. Hierzu gehört die Art der Aufbewahrung, wie sie das DAB 7 vorschreibt.

Weiter gehört es zu seinen Aufgaben bei der Überprüfung der Impfstoffhaltbarkeit, nicht nur auf das Verfalldatum zu achten, sondern auch die Fachpresse auf Veröffentlichungen hin durchzusehen, ob eine Impfstoffcharge vorzeitig aus dem Verkehr gezogen wird.

Geschieht es jedoch, daß die Bedingungen, denen das Verfalldatum unterliegt, nicht eingehalten wurden - z.B. Warenlieferung mit hitzeempfindlichem Impfstoff war unausgepackt zwei Tage und Nächte sommerlichen Temperaturen ausgesetzt - sind für den Apotheker die Möglichkeiten begrenzt, festzustellen, ob die wahre Haltbarkeitsgrenze bereits überschritten ist. Nur starke Veränderungen im Impfstoff lassen sich beobachten: nämlich daß ein ursprünglich trüber Impfstoff (Typhus) klar, daß ein ursprünglich klarer trüb wurde, daß ein Impfstoff ausflockte, sich verfärbte oder gar eintrocknete. Auch aus dem Farbumschlag eines Indikators, wie er mehreren Impfstoffen zugesetzt ist, kann er auf eine vorzeitige Qualitätsänderung schließen. Andererseits braucht das Ausbleiben eines Farbumschlages nicht unbedingt unveränderte

Impfstoffqualität zu bedeuten. Das soll heißen, nicht sichtbare Veränderungen, die aber die Impfstoffqualität nachteilig beeinflussen, entziehen sich seiner Beurteilung, da ihm die Mittel dazu in der Apotheke nicht zur Verfügung stehen. Theoretisch besteht für ihn die Möglichkeit, den betreffenden Impfstoff an ein Prüfinstitut oder an die Herstellerfirma einzusenden. Jedoch wird dies aus praktischen und wirtschaftlichen Gründen unterbleiben.

C Eigene Experimente zur Haltbarkeit von Impfstoffen

Im Experiment wurden Haltbarkeitsprüfungen sowohl an Impfstoffen aus vermehrungsfähigen als auch an solchen aus inaktivierten Viren vorgenommen. Und zwar diente ein Gelbfieber-Impfstoff als Modell fur einen Impfstoff aus vermehrungsfähigen Viren, während als Impfstoff aus durch Formalin inaktivierten Viren ein Poliomyelitis-Impfstoff gewählt wurde.

I Gelbfieber-Impfstoff:

Der Impfstoff enthält das im lebenden Hühnerembryo vermehrte Virus des 17-D-Stammes. Bei der Herstellung werden die Embryonen zerkleinert und zentrifugiert. Die uberstehende klare Flüssigkeit wird in Ampullen pipettiert und gefriergetrocknet. Die Ampullen werden unter Vakuum oder Stickstoff zugeschmolzen und mit einer Restfeuchtigkeit von weniger als 1% - angestrebt werden Werte um 0,5% - bei -25°C gelagert.

Über die Haltbarkeit von Gelbfieber-Impfstoffen gibt es nur wenig Arbeiten. Es wurde hauptsachlich bestimmt, wie stark sie durch hohe und tiefe Temperaturen beeinflußt werden (68, 69).

In dieser Arbeit wurde die Haltbarkeit des Impfstoffes in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit geprüft.

Die Wirksamkeit des Impfstoffes wurde im Infektionsversuch an der weißen Maus gemessen. Einzelheiten siehe "Material und Methoden". Als praxisnaher Fall wurde angenommen, das Glas der Impfstoffampullen sei in der Thermopackung gesprungen oder angebrochen.

a) Material und Methoden

Material:

Tiere: 180 weiße Mäuse (90 Männchen und 90 Weibchen), 16-20 g, Stamm NMRI (RKI)

Impfstoff: Nicht für die Abgabe geeigneter Gelbfieber-Impfstoff, gefriergetrocknet, pro Ampulle

eine Impfdosis, hergestellt im Robert Koch-Institut 9 Monate vorher.

Impfstoffverdünnung: ab 1:64 bis 1:16384
Verdünnungsfaktor 4

Verdünnungsmittel: 0,8%ige NaCl-Lösung, die 0,7% Rinderalbumin enthält.

Methoden:

Im Versuch wurden die der gleichen Herstellungscharge angehörenden Impfstoffampullen verschieden gelagert:

Impfstoff A : Bei -25°C in der Kühltruhe

Impfstoff B : 12 Tage im Brutschrank bei +40°C

Impfstoff C : 16 Stunden geöffnet in der Kühltruhe bei -25°C und bei einer relativen Feuchtigkeit ansteigend bis zu 75%. Anschließend wurden die Ampullen, mit Schaumgummistopfen verschlossen und paraffiniert, weiter bei -25°C gelagert (18 Tage bis zum Tierversuch).

Der Tierversuch wurde nach den Empfehlungen der WHO durchgeführt. Zunächst wurden aus den Impfstoffen mit dem Verdünnungsmittel die erforderlichen Impfstoffverdünnungen hergestellt. Anschließend erhielten 6 männliche und 6 weibliche Mäuse gleiche Mengen (nämlich je 0,03 ml) derselben Impfstoffverdünnung i.cer. Die Mäuse wurden 21 Tage lang beobachtet. Mäuse, die vor dem 10. Tag nach der Impfung starben, blieben unberücksichtigt. Nur Mäuse, die vom 10. Tag an nach einer Lähmung starben, galten als an spezifischer Gelbfieber-Enzephalitis gestorben.

b) Ergebnis:

Die Tabelle 7 zeigt protokollartig, wieviele Mäuse bei dem Versuch gestorben sind, und bildet die Grundlage für die Berechnung des Titers nach Reed und Muench (70). Als Titer des Gelbfieber-Impfstoffes gilt der reziproke Wert derjenigen Impfstoffverdünnung, die eine LD_{50} in 0,03 ml enthält; wobei man mit LD_{50} diejenige Impfstoffdosis bezeichnet, die für 50% der damit i.cer. geimpften Mäuse tödlich ist. Die

Impfstoff-verdünnung	Impfstoff A, gelagert bei −25° C						Impfstoff B, gelagert bei +40° C						Impfstoff C, gelagert in geöffneten Ampullen bei −25° C					
	intracerebral geimpfte Mäuse																	
	♂	gelähmt*	tot*	♀	gelähmt*	tot*	♂	gelähmt*	tot*	♀	gelähmt*	tot*	♂	gelähmt*	tot*	♀	gelähmt*	tot*
1:64	Nr. 1	11.	13	Nr. 1	11.	13.	Nr. 1			Nr. 1	10.	13.	Nr. 1		6.	Nr. 1	17.	18.
	" 2	11.	13.	" 2	11	16.	" 2			" 2			" 2	10.	13.	" 2	18.	
	" 3	13.	15.	" 3	14	20.	" 3			" 3			" 3	17.	20.	" 3		
	" 4	14.	16.	" 4	14	20.	" 4			" 4			" 4			" 4		
	" 5			" 5			" 5			" 5			" 5			" 5		
	" 6			" 6			" 6			" 6			" 6			" 6		
1:256	Nr. 1	11.	13.	Nr. 1			Nr. 1		1.	Nr. 1		7.	Nr. 1	11.	15.	Nr. 1	14.	15.
	" 2			" 2			" 2			" 2	17.	18.	" 2	15.	18.	" 2	20.	21.
	" 3			" 3			" 3			" 3			" 3			" 3		
	" 4			" 4			" 4			" 4			" 4			" 4		
	" 5			" 5			" 5			" 5			" 5			" 5		
	" 6			" 6			" 6			" 6			" 6			" 6		
1:1024	Nr. 1			Nr. 1	11.	13.	Nr. 1			Nr. 1			Nr. 1		7.	Nr. 1	13.	14.
	" 2			" 2	13.	15.	" 2			" 2			" 2			" 2	20.	21.
	" 3			" 3			" 3			" 3			" 3			" 3		
	" 4			" 4			" 4			" 4			" 4			" 4		
	" 5			" 5			" 5			" 5			" 5			" 5		
	" 6			" 6			" 6			" 6			" 6			" 6		
1:4096	Nr. 1			Nr. 1	13.	14.	Nr. 1			Nr. 1			Nr. 1			Nr. 1		
	" 2			" 2			" 2			" 2			" 2			" 2		
	" 3			" 3			" 3			" 3			" 3			" 3		
	" 4			" 4			" 4			" 4			" 4			" 4		
	" 5			" 5			" 5			" 5			" 5			" 5		
	" 6			" 6			" 6			" 6			" 6			" 6		
1:16384	Nr. 1			Nr. 1			Nr. 1			Nr. 1			Nr. 1		7.	Nr. 1		7.
	" 2			" 2			" 2			" 2			" 2			" 2		
	" 3			" 3			" 3			" 3			" 3			" 3		
	" 4			" 4			" 4			" 4			" 4			" 4		
	" 5			" 5			" 5			" 5			" 5			" 5		
	" 6			" 6			" 6			" 6			" 6			" 6		

Protokoll zum Test des Gelbfieber-Impfstoffes an der weißen Maus

* Tag nach der Impfung

Tabelle 7

Impfstoff A, gelagert bei −25°C							Impfstoff B, gelagert bei +40°C							Impfstoff C, gelagert in geöffneten Ampullen bei −25°C						
Reziproke Impfstoff-verdünnung	Anzahl Tiere pro Verdünnung lebend	tot	insgesamt lebend	tot	tot/Gesamtzahl	Mortalität %	Reziproke Impfstoff-verdünnung	Anzahl Tiere pro Verdünnung lebend	tot	insgesamt lebend	tot	tot/Gesamtzahl	Mortalität %	Reziproke Impfstoff-verdünnung	Anzahl Tiere pro Verdünnung lebend	tot	insgesamt lebend	tot	tot/Gesamtzahl	Mortalität %
64	4	8	4	12	12 : 16	75	64	11	1	11	2	2 : 13	15	64	7	3	7	9	9 : 16	56
256	11	1	15	4	4 : 19	21	256	9	1	20	1	1 : 21	5	256	8	4	15	6	6 : 21	29
1024	10	2	25	3	3 : 28	11	1024	12	0	32	0	0 : 32	0	1024	9	2	24	2	2 : 26	8
4096	11	1	36	1	1 : 37	3	4096	12	0	44	0	0 : 44	0	4096	12	0	36	0	0 : 36	0
16384	12	0	48	0	0 : 48	0	16384	12	0	56	0	0 : 56	0	16384	10	0	46	0	0 : 46	0

Abstandsfaktor $= \frac{75-50}{75-21} = 0{,}463$

$\log$ Titer $= \log 64 + [0{,}463 \cdot \log 4] = 2.08493$

Titer $= 121{,}6 \sim 4053\ LD_{50}/ml$

Titerberechnung nicht möglich

Titer < 64

Abstandsfaktor $= \frac{56-50}{56-29} = 0{,}222$

$\log$ Titer $= \log 64 + [0{,}222 \cdot \log 4] = 1.93984$

Titer $= 87{,}1 \sim 2902\ LD_{50}/ml$

Titerberechnung: $\log$ Titer = $\log$ Verdünnungsstufe mit nächst höherer (als 50%) Mortalität + [Abstandsfaktor · $\log$ Faktor der Verdünnungsreihe]

$$\text{Abstandsfaktor} = \frac{\%\ \text{nächst höhere (als 50\%) Mortalität} - 50}{\%\ \text{nächst höhere (als 50\%) Mortalität} - \%\ \text{nächst niedrigere (als 50\%) Mortalität}}$$

Titerbestimmung beim Gelbfieber-Impfstoff

Tabelle 8

Impfstoffwirksamkeit wird durch ihren Titer oder die Anzahl LD_{50} in 1 ml unverdünnten Impfstoff angegeben, so daß die Relation besteht

$$\text{Anzahl } LD_{50} = \frac{\text{Titer} \cdot 100}{3}$$

Für die Impfstoffe ergibt sich folgendes Ergebnis (Tabelle 8):

Impfstoff A : Titer = 121,6 entsprechend 4053 LD_{50}/ml
Impfstoff B : Titer < 64
Impfstoff C : Titer = 87,1 entsprechend 2902 LD_{50}/ml

Das Ergebnis zeigt:

1) Der Impfstoff, der als nicht abgabegeeignet deklariert war, hatte einen Titer von 121,6 bzw. 4053 LD_{50}/ml, er ist schwach wirksam. Es werden jedoch nur Gelbfieber-Impfstoffe abgegeben, die eine befriedigende Immunisierung beim Menschen hervorrufen. Die kleinste hierfür geeignete Menge wurde auf 500 LD_{50} festgesetzt (61). In der Regel werden jedoch 1000 LD_{50} injiziert. Daher muß ein Gelbfieber-Impfstoff als Einzeldosis - da 0,5 ml einer Verdünnung 1:10 zur Immunisierung verwendet werden - mindestens einen Titer von 600 bzw. 20 000 LD_{50}/ml besitzen.

2) Eine Lagerung von 12 Tagen bei +40°C zerstörte die Impfstoffwirksamkeit praktisch vollständig. Dies war nach Versuchen von Burrus und Hargett (68) auch zu erwarten.

3) Der Impfstoff C hat in seiner Qualität deutlich nachgelassen, verglichen mit den bei -25°C gelagerten Kontrollen. Die individuelle Empfindlichkeit der Maus und ihre individuelle Immunisierbarkeit zeigen sich auffallend.

Dies Ergebnis ist relativ günstig, weil der lyophilisierte Impfstoff als sehr feuchtigkeitsempfindlich gilt. Der Titerabfall im Verhältnis zur Kontrolle beträgt jedoch nur ca. 28%. Daraus könnte - mindestens theoretisch - gefolgert werden: Beim Transport angesprungene Impfstoffampullen können bei genügend hohem Ausgangstiter noch verwendet werden, wenn Gewähr dafür besteht, daß die Temperatur unverändert war und bleibt (-25°C) und der Impfstoff innerhalb kurzer Zeit verbraucht wird.

2. Poliomyelitis-Impfstoff aus inaktivierten Viren:

Arbeiten über die Haltbarkeit von Poliomyelitis-Impfstoffen wurden sowohl mit adsorbenshaltigen als auch mit adsorbensfreien Impfstoffen durchgeführt. Während die Adsorbatimpfstoffe ($Al[OH]_3$, Al_2O_3) auf ihre Haltbarkeit nach verschieden langer Aufbewahrungszeit bei +4°C geprüft wurden (41,71), bestimmte man bei den adsorbensfreien Impfstoffen - abgesehen von der Auswirkung quartärer Ammonium-Verbindungen auf die Haltbarkeit (14) und von der Wirksamkeit verschiedener Konservierungsstoffe (13) - den Einfluß höherer Temperaturen (s.o.).

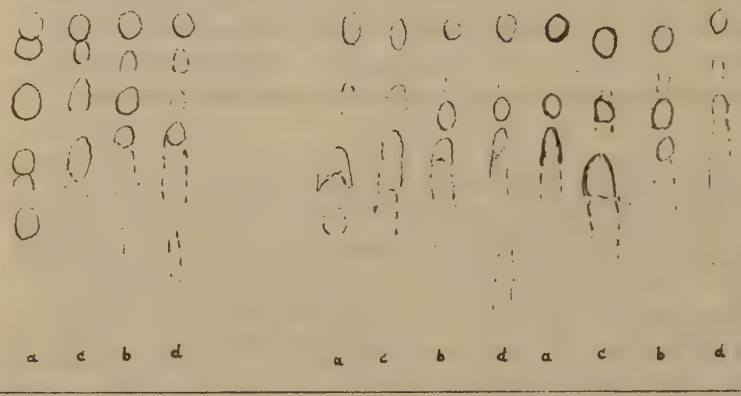
Bei der vorliegenden experimentellen Arbeit mit dem Poliomyelitis-Impfstoff sollte geklärt werden, wie weit sich Belastungen durch unterschiedliche Temperaturen auf die Haltbarkeit verschieden lang gelagerter Impfstoffe auswirken und ob hiermit eine Methode gegeben ist, die Unterwertigkeit zu beschreiben oder sogar die bevorstehende Unterwertigkeit vorauszusagen. In diesen Versuchen wurden der p_H-Wert, die Antigenität und das Deshämaggregationsvermögen der Impfstoffe bestimmt. Einzelheiten siehe "Material und Methoden".

1. Versuch:

Der Versuch sollte zeigen, ob sich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie eine Änderung der Aminosäurenzusammensetzung eines Poliomyelitis-Impfstoffes nachweisen läßt.

Sollte es zu einer Abspaltung von Aminosäuren vom Virusprotein schon bei einer Lagerung bei Zimmertemperatur kommen, müßte dies in erhöhtem Maß durch saure Hydrolyse geschehen. Aus diesem Grunde wurden folgende Proben verwendet:

a) ein unter Vakuum schonend konzentrierter Poliomyelitis-Impfstoff (4:1)
b) ein konzentrierter Impfstoff wie in a), vorher hydrolysiert (6n-HCl/+110°C/22 Stunden)
c) unter Vakuum schonend konzentriertes Parker-Medium (4:1)
d) Parker-Medium wie in c), vorher hydrolysiert zu Bedingungen wie in b)



a = Konzentrierter Poliomyelitis-Impfstoff
b = wie a, aber hydrolysiert (6n-HCl/+110°C/22 Stunden)
c = Konzentriertes Parker-Medium
d = wie c, aber hydrolysiert (6n-HCl/+110°C/22 Stunden)
Schicht: Kieselgel-G (Merck): Wasser = 1g:2g
Fließmittel: n-Propanol: Wasser = 16g:9g

Dünnschichtchromatogramm

Abbildung 1

Schicht: Kieselgel G (Merck) : Wasser = 1g : 2g
Fließmittel: n-Propanol:Wasser = 16g:9g

Ergebnis:

Abbildung 1 zeigt die Chromatogramme, aus denen hervorgeht, daß sich eine Änderung der Aminosäurenzusammensetzung eines Poliomyelitis-Impfstoffes dünnschichtchromatographisch nicht nachweisen läßt. Geringfügige Unterschiede bei den Proben Nr. 1 bis 4 (zwischen a,c und b,d) könnten auf Veränderungen im Parker-Medium zurückgeführt werden; auf das Ergebnis haben sie keinen Einfluß.

2. Versuch:
Es sollte festgestellt werden, welche Lagerungstemperaturen und -zeiten sich für den folgenden Versuch eignen.

a) Material und Methoden

Material:

Tiere: 60 Meerschweinchenböcke, 300-400 g, pro Impfstoffverdünnung 5 Tiere

Impfstoff +): Poliomyelitis-Impfstoff aus durch Formalin inaktivierten Viren, ohne Adsorptionsmittel,
Neomycinsulfat: entspr. 50mcg Neomycinbase/ml
Thimerosal: 1: 20 000
Na-EDTA: 7: 20 000
Firma Lilly

A: Frischer Impfstoff
B: Alter Impfstoff; Verfalldatum 8 Monate überschritten

Impfstoffverdünnungen: unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000
Verdünnungsmittel: Parker-Medium
Lagerungstemperaturen und -zeiten:

A: +4°C

+) Für das Überlassen des Impfstoffes durch die Lilly Research Laboratories, Indianapolis, sei Herrn Dr. Culbertson besonders gedankt.

B: +21°C/7 Tage = schwach belastet
und +21°C/7 Tage, zusätzlich 1/2 Stunde im Wasserbad bei +45°C (Thermostat), anschließend in Eiswasser gekühlt = stark belastet

Zellkulturen im Neutralisationstest: FL-Zellen
Virus im Neutralisationstest: Typ 1 Mahoney
Typ 2 MEF_1
Typ 3 Saukett
Verdünnungsmittel im Neutralisationstest: Color-Medium
(Hanks-Lösg.:Parker-Medium = 3:1)

Methoden:

Neben einer p_H-Wert-Messung an den unverdunnten Impfstoffen mit Merck'schem Indikatorpapier wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

1) Antigenitätsbestimmung

Immunisierung und Blutentnahme:

1 ml der entsprechend vorbehandelten Impfstoffe wurde am gleichen Tag 60 Meerschweinchen in den genannten Verdünnungen i.m. ins linke Hinterbein injiziert. Und zwar erhielten Gruppen von je 5 Meerschweinchen die gleiche Impfstoffverdünnung. Nach 6 Wochen wurde die Immunisierung mit denselben Impfstoffen, die solange bei +4°C aufbewahrt wurden, in den gleichen Verdünnungen wiederholt. Die Impfstoffverdünnungen wurden unmittelbar vor der Impfung mit Parker-Medium angefertigt. Am Tage vor der 1., am Tage vor der 2. und eine Woche nach der 2. Impfung wurde den Meerschweinchen Blut durch Herzpunktion entnommen. Von den zentrifugierten Blutproben wurde das Serum abpipettiert und einzeln in der Kühltruhe bei -20°C für den Neutralisationsversuch aufbewahrt.

Neutralisationstest:

Prinzip:
Die durch die Impfung gebildeten neutralisierenden Antikörper binden im Neutralisationsversuch das Virus derart, daß es nicht in der Lage ist, im gewachsenen Zellrasen einen zytopatho-

genen Effekt (CPE) zu erzeugen. Bestimmt wird diejenige Serumverdünnung, die noch die Zellen vor einem CPE zu schützen vermag. Sie wird als Titer des Serums bezeichnet.

Um schnell einen Überblick über den Ausgang des Versuches zu bekommen, wurden aus den Einzelseren Mischseren zu je 1 ml hergestellt; und zwar derart, daß jedes Mischserum zu gleichen Teilen aus den Seren derjenigen Tiere bestand, die mit der gleichen Impfstoffverdünnung desselben Impfstoffes geimpft worden waren. Auf diese Weise wurden dreimal 12 Mischseren erhalten - entsprechend den 3 Blutentnahmeterminen -, die auf ihren Antikörpertiter geprüft wurden. Im weiteren Verlauf wurden auch Einzelseren untersucht.

Im Neutralisationstest wurden Serumverdunnungen 1:4, 1:8, 1:16 usw. mit 100 ID_{50} vermehrungsfähigem Virus gemischt. Von jedem Serum wurden 3 Verdunnungsreihen angelegt, entsprechend den 3 Virustypen. Die Gemische wurden mit flüssigem Paraffin überschichtet und bei +37°C 1 Stunde lang inkubiert. Darauf wurde die Zellsuspension zugesetzt und nach 3 - 4 Tagen mikroskopisch das Ergebnis abgelesen. Einzelheiten der Methode siehe bei Grützner (72).

d_{50}-Bestimmung:

Für die Bestimmung der d_{50} nach Reed und Muench wurden die im Neutralisationstest ermittelten Ergebnisse der Einzelseren verwendet. Ein Titer von 1:4 galt als positiv. Da sich hierbei zu wenig von 0 und 100 verschiedene Werte für den prozentualen Anteil an Antikörper bildenden Tieren ergab, wurde die Tatsache genutzt, daß es bei Impfstoffen eine Dosis-Wirkung-Beziehung gibt. Trägt man in einem Koordinatennetz die Logarithmen der Impfstoffverdünnungen gegen die Probits der Prozentzahlen der erzeugten Wirksamkeit, ergibt sich eine mit steigender Verdünnung abfallende Gerade. Bei gleichartigen, aber verschieden wirksamen Impfstoffen ist die Steigung der Geraden die gleiche, nur sind die einzelnen Geraden parallel zueinander verschoben. Für den Punkt auf der Geraden, der dem zu 50% gehörenden Probitwert entspricht, kann dann leicht die zugehörige Impfstoffverdünnung abgelesen werden: die d_{50}.

Bei bekannter Steigung s genügt es, die Bestimmung mit einer einzigen Impfstoffverdünnung durchzuführen bzw. mit einem einzigen der erhaltenen Werte zu rechnen nach der Gleichung

$$\lg d_{50} = \frac{p_{50} - p_b + s \cdot \lg d_b}{s}$$

Hierbei ist p_{50} = Probitwert für 50%
p_b = Probitwert für beobachteten %-Wert
d_b = die p_b entsprechende Impfstoffverdünnung
s = Steigung der Geraden

War die Steigung s unbekannt, wurde sie bestimmt nach der Gleichung

$$s = \frac{Sxy - Sx\bar{y}}{Sx^2 - n\bar{x}^2}$$

Hierbei ist S = Summe
$\bar{y}$ = Mittelwert der y-Werte
$\bar{x}$ = Mittelwert der x-Werte
n = Anzahl der x bzw. y-Werte

2) Deshämaggregationsbestimmung:

Parallel zur Antigenitätsprüfung wurde mit den Impfstoffen eine Deshämaggregationsbestimmung nach der von Drescher und Schrader (67) ausgearbeiteten Methode durchgeführt.

Prinzip:
Mit Trypsin vorbehandelte menschliche Erythrozyten aggregieren spontan in einer gepufferten Glukoselösung von geringer Ionenstärke. Diese Hämaggregation kann durch hinzugefügte Viren verhindert und die entsprechende Deshämaggregation photometrisch gemessen werden. Sie ist in bestimmtem Bereich abhängig von der Viruskonzentration. Ausgangspunkt ist der durch die optische Dichte bei einem Deshämaggregationsgrad $\alpha = 0{,}37$ erzeugte Extinktionswert E_{100}. E_{100} wird durch die jedesmal mitgemessenen Werte E_1 (vollständige Hämaggregation) und E_2 (vollständige Deshämaggregation) bestimmt nach der Gleichung

$$E_{100} = 0{,}63\ E_1 + 0{,}37\ E_2$$

Diejenige Virusverdünnung (d_{100}), die einen Deshämaggregationsgrad $\alpha = 0{,}37$ erzeugt, besitzt - so wurde definiert - 100 Deshämaggregationseinheiten (HIU = Hemaggregation Inhibition Units). 100 multipliziert mit dem Faktor dieser Virusverdünnung ergibt den Deshämaggregationstiter der Virussuspension (HIU/ml).

Bei der praktischen Ausführung wird der Deshämaggregationsgrad, den abgestufte Virusverdünnungen erzeugen, photometrisch gemessen. Die erhaltenen Extinktionswerte werden auf mm-Papier, dessen beide Achsen logarithmisch geteilt sind, gegen die entsprechenden Virusverdünnungen aufgetragen. Verbindet man die Punkte, erhält man eine mit steigender Virusverdünnung abfallende Gerade. Sucht man sich auf dieser Geraden den zu E_{100} gehörenden Punkt, trifft man, von ihm senkrecht ausgehend, auf die Virusverdünnung d_{100}.

Die Virusverdünnung d_{100} - und damit der Deshämaggregationstiter - läßt sich aber auch aus der Steigung der Geraden s, ihrem Schnittpunkt mit der y-Achse e und dem E_{100}-Wert berechnen nach der Gleichung

$$\lg d_{100} = \frac{\lg E_{100} - e}{s}$$

Hierbei ist

$$s = \frac{Sxy - Sx\bar{y}}{Sx^2 - n\bar{x}^2}$$

$$e = \bar{y} - s\bar{x}$$

Drescher und Schrader (67) geben für ihre Methode, angewandt bei Poliomyelitis-Impfstoffen aus inaktivierten Viren aller drei Typen, eine Standardabweichung von 10% an.

Einzelheiten der Methode siehe bei den Autoren (67).

b) Ergebnisse

Während die p_H-Messungen stets die gleichen Werte ergaben, zeigten die anderen Bestimmungen folgende Ergebnisse:

1) Antigenitätsbestimmung

Titer der Mischseren:

Das Ergebnis zeigt Tabelle 9. Der Serumtiter < 1:4 läßt erkennen, daß die Meerschweinchen zu Versuchsbeginn (vor der 1.

Meerschweinchen	Impfstoff	Lagerungstemperatur d. Impfstoffe	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Seren								
				vor 1. Impfung			nach 1. Impfung			nach 2. Impfung		
Nr. 1 - 5	A	+4°C	10^{0}	<4	<4	<4	<4	4	<4	64	32	32
" 6 - 10			10^{-1}	<4	<4	<4	<4	4	<4	32 *	16 *	16 *
" 11 - 15			10^{-2}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	16 *	16 *	16 *
" 16 - 20			10^{-3}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4 *	<4 *	<4 *
Nr. 21 - 25	$B_{schwach\ belastet}$	+22°C	10^{0}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	32 *	64	64
" 26 - 30			10^{-1}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	8 *	32 *	16 *
" 31 - 35			10^{-2}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4 *	4 *	16 *
" 36 - 40			10^{-3}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4 *	<4 *
Nr. 41 - 45	$B_{stark\ belastet}$	+22°C und +45°C	10^{0}	<4	<4	<4	<4	16	<4	<4 *	16	4 *
" 46 - 50			10^{-1}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	4 *	32 *	4 *
" 51 - 55			10^{-2}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4 *	8 *	<4 *
" 56 - 60			10^{-3}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4 *	<4
				1	2	3	1	2	3	1	2	3
				POLIOMYELITISVIRUS TYP								

*Untersuchung auch als Einzelseren (siehe Tabelle 10)

Antikörpertiter der Meerschweinchenmischseren nach Immunisierung mit den Impfstoffen A und B

Tabelle 9

Impfung) keine spezifisch neutralisierenden Antikörper gegen Poliomyelitis-Viren besaßen und daher für den Versuch geeignet waren. Den Erfolg der Impfung zeigt der Titeranstieg nach der 2. Impfung, der allerdings bei beiden Impfstoffen verschieden hoch ist. Außerdem ließ sich erkennen, wo eine Differenzierung nach Einzelseren angebracht schien: nämlich bei den Seren - gewonnen nach der 2. Impfung -, deren schwächste Verdünnung einen Titer $<1:4$ zeigte, und den beiden davor liegenden Verdünnungen.

Titer der Einzelseren:

Das Ergebnis zeigt Tabelle 10. Zum Vergleich wurden die bei den Mischseren erhaltenen Titer mit in die Tabelle eingearbeitet. Man erkennt die recht gute Übereinstimmung der Einzelseren-Titer mit denen der Mischseren. Sie wurden daher für die Bestimmung der d_{50} nach Reed und Muench benutzt.

Impfstoff A, gelagert bei +4°C

Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Einzelseren		
		Poliomyelitisvirus Typ 1	2	3	1	2	3
Nr. 1					—	—	—
" 2					—	—	—
" 3 †	10^{0}	64	32	32	—	—	—
" 4					—	—	—
" 5 †					—	—	—
Nr. 6					8	8	16
" 7					8	8	16
" 8	10^{-1}	32	16	32	>32	>32	16
" 9					64	16	32
" 10					16	16	64
Nr. 11					32	8	4
" 12					>32	16	>32
" 13 †	10^{-2}	16	16	16	—	—	—
" 14					16	16	32
" 15					16	32	16
Nr. 16					<4	4	<4
" 17					<4	<4	<4
" 18	10^{-3}	<4	<4	<4	4	<4	<4
" 19					<4	<4	4
" 20 †					—	—	—

Impfstoff B, gelagert bei +21°C

Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Einzelseren		
		Poliomyelitisvirus Typ 1	2	3	1	2	3
Nr. 21 †					—	—	—
" 22					<4	—	—
" 23	10^{0}	32	64	64	16	—	—
" 24					8	—	—
" 25					32	—	—
Nr. 26					8	8	<4
" 27					8	16	8
" 28	10^{-1}	8	32	16	<8	8	8
" 29					<4	4	8
" 30					<4	4	>16
Nr. 31					<4	<4	<4
" 32					4	<4	4
" 33	10^{-2}	<4	4	16	8	4	<4
" 34					<4	<4	4
" 35					<4	4	<4
Nr. 36					—	<4	<4
" 37					—	<4	<4
" 38	10^{-3}	<4	<4	<4	—	<4	<4
" 39					—	<4	<4
" 40					—	<4	<4

Impfstoff B, gelagert bei +21° und +45°C

Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Einzelseren		
		Poliomyelitisvirus Typ 1	2	3	1	2	3
Nr. 41					>8	—	>8
" 42					>8	—	>8
" 43	10^{0}	<4	16	4	>8	—	>8
" 44					>8	—	<4
" 45					>8	—	>8
Nr. 46					4	4	4
" 47 †					—	—	—
" 48	10^{-1}	4	32	4	<8	>16	<8
" 49 †					—	—	—
" 50					<4	8	<4
Nr. 51					<4	4	4
" 52					<4	<4	<4
" 53	10^{-2}	<4	8	<4	<4	<4	<4
" 54					<4	4	<4
" 55					4	>8	4
Nr. 56					—	<4	—
" 57					—	<4	—
" 58	10^{-3}	<4	<4	<4	—	<4	—
" 59					—	<4	—
" 60 †					—	—	—

† Versuchstier vorzeitig gestorben — Titer wurde nicht bestimmt

Antikörpertiter der Meerschweinchen-Misch- und Einzelseren nach der Wiederholungsimpfung mit den Impfstoffen A und B

Tabelle 10

Poliomyelitisvirus Typ	Impfstoffverdünnung	Impfstoff A, gelagert bei +4°C						Impfstoff B, gelagert bei +21°C						Impfstoff B, gelagert bei +21°C und +45°C					
		Anzahl Tiere pro Verdünnung		insgesamt			Tiere (%) mit positiver* Reaktion	Anzahl Tiere pro Verdünnung		insgesamt			Tiere (%) mit positiver* Reaktion	Anzahl Tiere pro Verdünnung		insgesamt			Tiere (%) mit positiver* Reaktion
		positiv*	negativ*	positiv*	negativ*	positiv* / Gesamtzahl		positiv*	negativ*	positiv*	negativ*	positiv* / Gesamtzahl		positiv*	negativ*	positiv*	negativ*	positiv* / Gesamtzahl	
1	10^0	3	0	13	0	13 : 13	100	3	1	7	1	7 : 8	88	5	0	7	0	7 : 7	100
	10^{-1}	5	0	10	0	10 : 10	100	2	3	4	4	4 : 8	50	1	2	2	2	2 : 4	50
	10^{-2}	4	0	5	0	5 : 5	100	2	3	2	7	2 : 9	22	1	4	1	6	1 : 7	14
	10^{-3}	1	3	1	3	1 : 4	25	0	5	0	12	0 : 12	0	0	4	0	10	0 : 10	0
2	10^0	3	0	13	0	13 : 13	100	4	0	11	0	11 : 11	100	5	0	11	0	11 : 11	100
	10^{-1}	5	0	10	0	10 : 10	100	5	0	7	0	7 : 7	100	3	0	6	0	6 : 6	100
	10^{-2}	4	0	5	0	5 : 5	100	2	3	2	3	2 : 5	40	3	2	3	2	3 : 5	60
	10^{-3}	1	3	1	3	1 : 4	25	0	5	0	8	0 : 8	0	0	4	0	6	0 : 6	0
3	10^0	3	0	13	0	13 : 13	100	4	0	10	0	10 : 10	100	4	1	7	1	7 : 8	88
	10^{-1}	5	0	10	0	10 : 10	100	4	1	6	1	6 : 7	86	1	2	3	3	3 : 6	50
	10^{-2}	4	0	5	0	5 : 5	100	2	3	2	4	2 : 6	33	2	3	2	6	2 : 8	25
	10^{-3}	1	3	1	3	1 : 4	25	0	5	0	9	0 : 9	0	0	4	0	10	0 : 10	0

* Antikörpertiter ab 1:4 = positiv

Antigenität der Poliomyelitis-Impfstoffe A und B

erkennbar am Prozentsatz Antikörper bildender Tiere

Tabelle 11

d_{50}-Bestimmung:

Die bei der Berechnung nach Reed und Muench erhaltenen Prozentwerte (Tabelle 11) wurden der d_{50}-Bestimmung zugrunde gelegt. In drei Fällen läßt sich die d_{50} direkt ablesen: Für Typ 1 beim schwach und beim stark belasteten Impfstoff B und für Typ 3 beim stark belasteten Impfstoff B; sie beträgt jedesmal d_{50}=10. In allen anderen Fällen wurde die d_{50} berechnet. Es wurde für s der Mittelwert aus den Steigungen s_B schwach belastet, Typ 1 und s_B stark belastet, Typ 3 benutzt, da hier die meisten Werte von 0 und 100 verschieden waren. Er betrug s = -0,9492. Zur d_{50}-Berechnung wurde mit Hilfe der o.a. Formel jeweils von derjenigen Impfstoffverdünnung (d_b) ausgegangen, die die geringste Wirksamkeit (p_b) - ausgenommen 0% - zeigte.

Die Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse für die beiden Impfstoffe. Ein Unterschied in der antigenen Wirksamkeit läßt sich

Virus-Typ	Impfstoff A	Impfstoff B	
		schwach belastet	stark belastet
1	5135,7	10	10
2	5135,7	54,1	184,8
3	5135,7	34,4	10

d_{50}-Werte der Poliomyelitis-Impfstoffe A und B

Tabelle 12

sehr gut beim Impfstoff A einerseits und dem schwach und stark belasteten Impfstoff B andererseits erkennen. Um 50% der Tiere zur Antikörperbildung anzuregen, kann der Impf-

stoff A ca. 25 bis 500 mal so stark verdünnt werden wie der Impfstoff B.

2) Deshämaggregationsbestimmung

Für die Impfstoffe A und B wurden bei folgenden Impfstoffverdünnungen die angeführten Extinktionswerte gemessen:

Impfstoff	Impfstoff-verdünnung	Extinktion	
A	20	1,90	
	50	1,825	
	200	1,748	
	500	1,575	
B schwach belastet	20	1,870	E_1 = 1,100
	50	1,849	E_2 = 1,885
	200	1,672	E_{100} = 1,379
	500	1,547	
B stark belastet	20	1,818	
	50	1,747	
	200	1,505	
	500	1,550	

Durch Übertragen der Werteauf mm-Papier und durch Ausziehen der Geraden wurde die Abbildung 2 erhalten.

In Übereinstimmung hiermit ergab die Berechnung der d_{100} nach der o.a. Formel für die beiden Impfstoffe

A : d_{100} = 8929
B (schwach belastet) : d_{100} = 4075
B (stark belastet) : d_{100} = 2130

so daß die entsprechenden Deshämaggregationstiter lauteten:

Impfstoff A : 892 900 HIU/ml
" B (schwach belastet) : 407 500 HIU/ml
" B (stark belastet) : 213 000 HIU/ml

3) Zusammenfassung der Ergebnisse des 2. Versuches

Da bei dem Versuch zwei verschiedene Impfstoffe bei verschiedenen Temperaturen gelagert worden waren, lassen sich die Ergebnisse nur bedingt vergleichen. Jedoch läßt sich sagen,

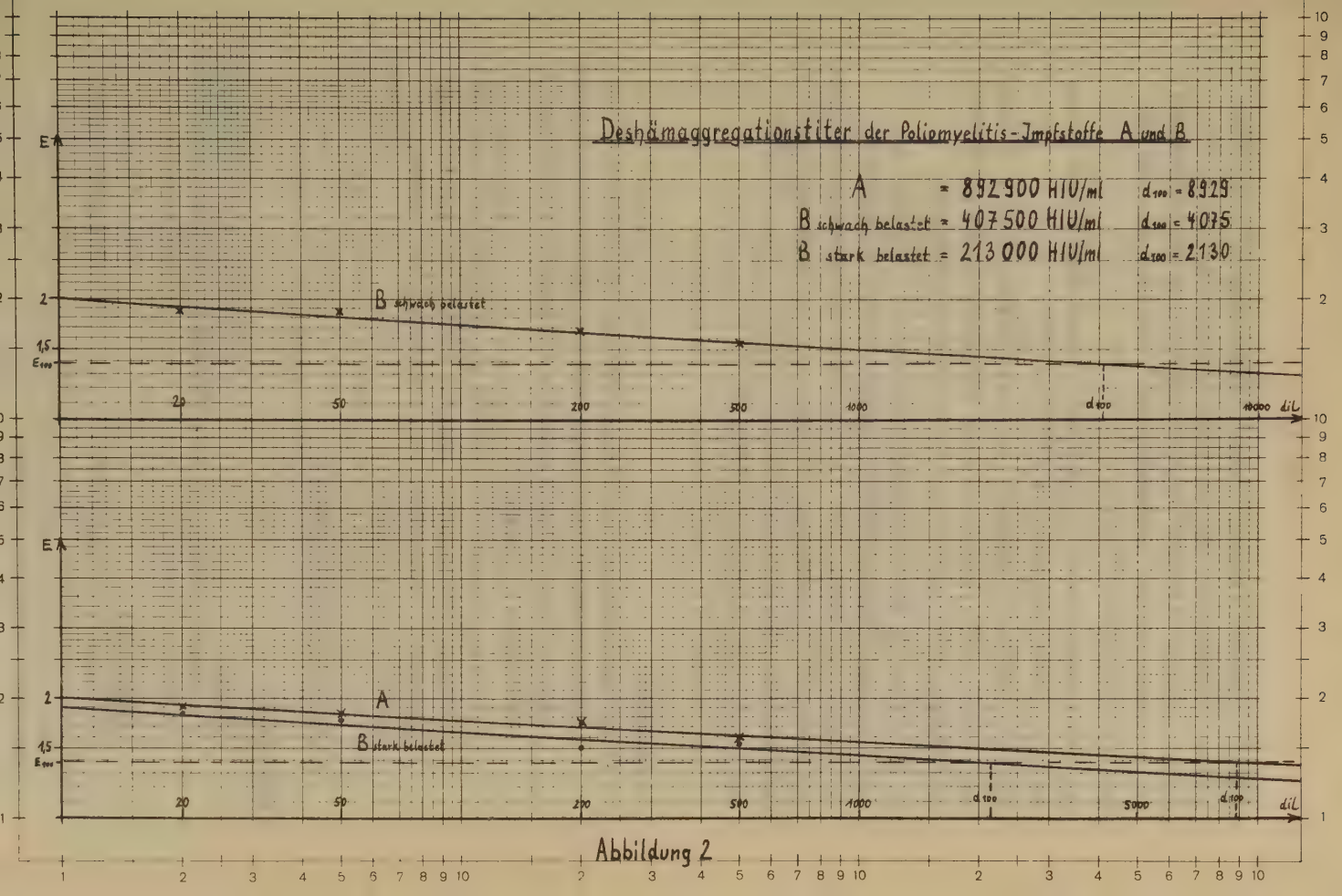

Deshämaggregationstiter der Poliomyelitis-Impfstoffe A und B
A = 892 900 HIU/ml d100 = 8929
B schwach belastet = 407 500 HIU/ml d100 = 4075
B stark belastet = 213 000 HIU/ml d100 = 2130
E
B schwach belastet
A
B stark belastet
20
50
200
500
1000
5000
10000
dil
d100
E100
1,5
2

Abbildung 2

daß der Impfstoff A noch bis zur Verdünnung 10^{-2} für alle 3 Typen wirksam ist, während sich bei dem Impfstoff B, sowohl schwach als auch stark belastet, ein entsprechendes Ergebnis nur bis zur Verdünnung 10^{-1} und auch nur für den Typ 2 zeigt (Tabelle 11).

Die Überlegenheit des Impfstoffes A kommt auch durch seinen hohen d_{50}-Wert zum Ausdruck (Tabelle 12).

Der Unterschied im Ergebnis der Antigenitätsprüfung zwischen dem schwach und stark belasteten Impfstoff B war nicht sehr ausgeprägt, wie aus der Tabelle 11 ersichtlich ist.

Im Gegensatz zu der antigenen Eigenschaft, trat bei der Deshämaggregationsbestimmung ein deutlicher Unterschied auf. Abgesehen davon, daß der Impfstoff A das ausgeprägteste Deshämaggregationsvermögen zeigte, war das Deshämaggregationsvermögen des stark belasteten Impfstoffes B ca. 50% niedriger als das des schwach belasteten.

3. Versuch:

1) Im Gegensatz zu dem vorigen Versuch wurden Proben von jedem Impfstoff bei einer größeren Reihe verschiedener Temperaturen gelagert, um damit bessere Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen.

2) Die Belastungszeit bei +45°C wurde verdoppelt und auf 1 Stunde festgesetzt. Dadurch sollte ein stärker ausgeprägter Unterschied zur siebentägigen Lagerung bei +20°C erzielt werden.

a) Material und Methoden

Material:

Tiere:

192 Meerschweinchenböcke, 300-400g, pro Impfstoffverdünnung 4 Tiere

Impfstoff:

Poliomyelitis-Impfstoff +) aus durch Formalin inakti-

+) Für das Überlassen des Impfstoffes durch die Connaught Medical Research Laboratories, Toronto, sei Herrn Dr. Ferguson besonders gedankt.

vierten Viren der Typen 1, 2, 3, ohne Adsorptionsmittel, mit

0,15 % Methyl Paraben
0,015% Propyl Paraben
höchstens { 200 mcg Streptomycin
20 E Polymyxin B
8 E Neomycin

der Firma Connaught

K: frischer Impfstoff
L: Impfstoff, der schon 2 Jahre bei +4°C lagerte
M: Impfstoff, der schon 3 Jahre bei +4°C lagerte

Impfstoffverdünnungen und Verdünnungsmittel:
Wie im vorigen Versuch

Lagerungstemperaturen und -zeiten:

+4°C (Kontrollen)
+4°C, zusätzlich 1 Stunde im Wasserbad bei +45°C (Thermostat), anschließend in Eiswasser gekühlt
+20°C/1 Woche
+20°C/1 Woche, zusätzlich 1 Stunde im Wasserbad bei +45°C (Thermostat), anschließend in Eiswasser gekühlt

Material für den Neutralisationstest:

Wie im vorigen Versuch

Methoden:

Wie im vorigen Versuch wurden neben einer p_H-Wert-Messung an den unverdünnten Impfstoffen mit Merck'schem Indikatorpapier folgende Bestimmungen durchgeführt:

1) Antigenitätsbestimmung
Immunisierung und Blutentnahme:
Wie im vorigen Versuch

Neutralisationstest:
Wie im vorigen Versuch

Ausnahme: Es wurden die nach der Wiederholungsimpfung gewonnenen Einzelseren - soweit die Menge ausreichte - sämtlich auch einzeln geprüft.

d_{50}-Bestimmung:
Wie im vorigen Versuch

Bestimmung des mittleren geometrischen Titers:

Ebenso wie mittels der d_{50}, so läßt sich auch durch den mittleren geometrischen Titer (m.g.t.) - je größer sein Wert, desto höher die hervorgerufene Antikörperkonzentration im Serum - auf die Wirksamkeit eines Impfstoffes schließen. Aus diesem Grunde und zum Vergleich mit den d_{50}-Werten wurde der m.g.t. der Impfstoffe aus den erhaltenen Mischseren berechnet nach der Gleichung

$$m.g.t. = 2^{\frac{S_{exp}}{n_{exp}}}$$

Hierbei ist

S_{exp} = Summe der Exponenten

n_{exp} = Anzahl der Exponenten

Hierfür mußten die reziproken Serumtiter als Vielfaches von 2 ausgedrückt werden (z.B.: Titer 1:16 als 2^4). Ein Titer < 4 wurde als 2^1 geschrieben. Der m.g.t. ergab sich jeweils aus den durch die vier angewandten Impfstoffverdünnungen erzielten Serumtiter.

2) Deshämaggregationsbestimmung
Wie im vorigen Versuch

Hierbei wurde eine zusätzliche Bestimmung durchgeführt, nachdem die Impfstoffe mit Nukleasen behandelt worden waren. Da Nukleinsäuren unter bestimmten Bedingungen ebenfalls die Aggregation von Erythrozyten verhindern (73), sollte auf diese Weise festgestellt werden, ob der erhaltene Deshämaggregationstiter allein durch Viren hervorgerufen wurde oder auch durch Nukleinsäure, die durch Viruszerfall frei geworden ist.

b) Ergebnisse

Während die p_H-Messungen stets die gleichen Werte ergaben, zeigten die anderen Bestimmungen folgende Ergebnisse:

1) Antigenitätsbestimmung

Titer der Mischseren:

Die bei den Mischseren erhaltenen Ergebnisse zeigt die Tabelle 13. Man erkennt hier, daß schon die sogenannten "Null"-Seren (die vor der 1. Impfung gewonnenen Seren) einige Male den Titer 1:4 besitzen. Da aber nur in 2 von 18 Fällen der Titer durch die Impfung ansteigt, ist anzunehmen, daß es sich bei diesen Seren nicht um den Titer spezifisch neutralisierender Antikörper handelt, sondern um unspezifische Hemmstoffe. Diese Hemmstoffe treten in der Zeit nach der Impfung zurück. Die Antikörperbildung kommt zunächst langsam in Gang. Erst durch die Wiederholungsimpfung erfolgt ein in der Regel sprunghafter Titeranstieg. Daher kann ein nach der Wiederholungsimpfung gefundener, wenn auch niedriger Serumtiter aller Wahrscheinlichkeit nach als spezifisch angesehen werden.

Titer der Einzelseren:

In den Tabellen 14-16 sind die Titer der nach der Wiederholungsimpfung gewonnenen Einzelseren zum Vergleich zusammen mit denen der Mischseren aufgeführt. Eine Übereinstimmung der Werte ist recht gut zu erkennen (s. Tabellen).

Ergebnis der d_{50}-Bestimmung:

Mit Hilfe der beim Impfstoff K (gelagert bei $+4^{\circ}C$, Typ 1) errechneten Steigung $s = - 0{,}76864$ ließen sich die übrigen d_{50}-Werte bestimmen, soweit die Prozentzahlen von 0 und 100 verschieden waren.

Die d_{50}-Werte sind in den Tabellen 17-19 enthalten.

Reziproker Antikörpertiter	Impfstoff	Art der Impfstofflagerung * 4	4+	20	20+	Poliomyelitis-virus Typ
vor 1. Impfung	K	• • • •	4 • • 4	4 • 4 4	• • • •	1
		• • • •	• • • •	• • • •	• • • 4	2
		• • • •	• • • •	• • • •	• • • •	3
nach 1. Impfung		• • • •	• • • •	• • • •	• • • •	1
		64 4 8 •	16 4 • •	8 • • •	4 • 4 4	2
		• • • •	• • 4 •	• • • •	• • • •	3
nach 2. Impfung		256 4 • 4	4 • • •	† • 4 •	4 • • •	1
		256 8 4 4	64 4 • •	† • • •	32 • • 4	2
		128 8 • 4	• • • •	† • • •	• • • •	3
vor 1. Impfung	L	• • • •	• • • •	• 4 • •	4 • • •	1
		• • • •	• • • •	• • • •	• • • •	2
		• • • •	• • • •	• • • •	• • • •	3
nach 1. Impfung		• • • •	4 • • •	• • • •	• • • •	1
		8 • • •	8 • • •	• • • •	4 4 • •	2
		4 • • •	• • • •	• • • •	4 • • •	3
nach 2. Impfung		128 4 4 •	4 8 • 4	4 • • •	• • • •	1
		64 • • •	16 8 • •	8 • • •	• • • •	2
		256 • • •	4 4 • •	4 • • •	• • • •	3
vor 1. Impfung	M	• • • •	4 4 4 •	4 4 4 4	4 4 • 4	1
		• • • •	• • • •	• • • •	• • • •	2
		• • • •	• • • •	• • • •	• • • •	3
nach 1. Impfung		• • • •	4 • • •	8 4 • •	4 8 • •	1
		16 • • •	16 4 • •	16 • • •	4 4 • •	2
		4 • • •	4 • • •	• • • •	4 4 • •	3
nach 2. Impfung		32 • 4 •	32 4 • •	64 • • •	4 4 4 •	1
		32 • • •	16 4 • •	64 4 • •	8 8 • •	2
		8 • • •	128 • • •	4 • • •	4 4 • •	3
		10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}	10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}	10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}	10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}	
		Impfstoffverdünnungen				

* 4 = Lagerung bei + 4°C
4+ = " " + 4°C und +45°C/1 Std.
20 = " " +20°C/1 Woche
20+ = " " +20°C/1 Woche und +45°C/1 Std.

† Versuchstiere vorzeitig gestorben • Titer <4

Reziproke Antikörpertiter der Meerschweinchen-Mischseren
nach Immunisierung mit den Impfstoffen K, L und M

Tabelle 13

Impfstofflagerung bei +4°C						Impfstofflagerung bei +4°C und bei +45°C/1 Std.						Impfstofflagerung bei +20°C/1 Woche						Impfstofflagerung bei +20°C/1 Woche und +45°C/1 Std.					
Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Reziproke Titer der Einzelseren *				Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Reziproke Titer der Einzelseren *				Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Reziproke Titer der Einzelseren *		
		1	2	3	1	2	3				1	2	3	1	2	3				1	2	3	1	2	3
Nr. 1	10^{0}	256	256	128	>16	>16	4		Nr. 17†	10^{0}	4	64	<4	—	—	—		Nr. 33†	10^{0}	—	—	—	—	—	—	Nr. 49	10^{0}	4	32	<4	8	>16	4
" 2					<4	>16	<4		" 18					16	>32	<4		" 34†					—	—	—	" 50					<4	>16	<4
" 3					8	>16	<4		" 19					4	>16	4		" 35†					—	—	—	" 51†					—	—	—
" 4					>16	>16	8		" 20†					—	—	—		" 36†					—	—	—	" 52					<4	8	<4
Nr. 5	10^{-1}	4	8	8	<4	8	4		Nr. 21†	10^{-1}	<4	4	<4	—	—	—		Nr. 37	10^{-1}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	Nr 53†	10^{-1}	<4	<4	<4	—	—	—
" 6					4	>16	<4		" 22					<4	4	<4		" 38†					—	—	—	" 54					<4	<4	<4
" 7					<4	8	8		" 23†					—	—	—		" 39					<4	<4	<4	" 55†					—	—	—
" 8†					—	—	—		" 24†					—	—	—		" 40†					—	—	—	" 56					<4	<4	<4
Nr. 9	10^{-2}	<4	4	<4	<4	<4	<4		Nr. 25†	10^{-2}	<4	<4	<4	—	—	—		Nr. 41†	10^{-2}	4	<4	<4	—	—	—	Nr 57	10^{-2}	<4	<4	<4	<4	<4	<4
" 10					4	<4	<4		" 26†					—	—	—		" 42†					—	—	—	" 58					<4	<4	<4
" 11					<4	<4	<4		" 27†					—	—	—		" 43					<4	<4	<4	" 59					<4	<4	<4
" 12					8	8	<4		" 28					<4	<4	<4		" 44					<4	<4	<4	" 60					<4	<4	<4
Nr. 13	10^{-3}	4	4	4	<4	<4	<4		Nr. 29†	10^{-3}	<4	<4	<4	—	—	—		Nr. 45	10^{-3}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	Nr. 61	10^{-3}	<4	4	<4	<4	<4	<4
" 14					4	<4	<4		" 30†					—	—	—		" 46†					—	—	—	" 62					<4	<4	<4
" 15					<4	<4	<4		" 31†					—	—	—		" 47†					—	—	—	" 63†					—	—	—
" 16					<4	<4	<4		" 32					<4	<4	<4		" 48†					—	—	—	" 64†					—	—	—
		1	2	3	1	2	3				1	2	3	1	2	3				1	2	3	1	2	3
		Poliomyelitisvirus Typ									Poliomyelitisvirus Typ									Poliomyelitisvirus Typ					

* in der Regel nur bis 1:16 untersucht — Titer wurde nicht bestimmt † Tier während des Versuchs gestorben

Antikörpertiter der Meerschweinchen- Misch- und Einzelseren nach der Wiederholungsimpfung mit dem Poliomyelitis-Impfstoff K

Tabelle 14

Impfstofflagerung bei +4°C					Impfstofflagerung bei +4°C und bei +45°C/1 Std.					Impfstofflagerung bei +45°C/1 Woche					Impfstofflagerung bei +20°C/1 Woche und +45°C/1 Std.				
Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Reziproke Titer der Einzelseren*			Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Reziproke Titer der Einzelseren*			Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Reziproke Titer der Einzelseren*		
		1	2	3	1	2	3			1	2	3	1	2	3			1	2	3	1	2	3
Nr. 65	10^{0}	128	64	256	>16	8	4	Nr. 81	10^{0}	4	16	4	>16	16	4	Nr. 97	10^{0}	4	8	4	8	8	<4	Nr. 113†	10^{0}	<4	<4	<4	—	—	—
" 66					>16	>16	4	" 82					>16	>16	8	98†					—	—	—	" 114†					—	—
" 67					8	>16	8	" 83					8	>16	8	" 99					4	>16	8	" 115†					—	—
" 68					>16	8	>16	" 84					8	16	<4	" 100†					—	—	—	" 116					—	—
Nr. 69	10^{-1}	4	<4	<4	<4	4	<4	Nr. 85†	10^{-1}	8	8	4	—	—	—	Nr. 101†	10^{-1}	<4	<4	<4	—	—	—	Nr. 117	10^{-1}	<4	<4	<4	<4	<4	<4
" 70†					—	—	—	" 86†					—	—	—	" 102					<4	<4	<4	" 118†					—	—
" 71†					—	—	—	" 87					—	—	—	" 103†					—	—	—	" 119					—	—
" 72					<4	8	<4	" 88					8	8	<4	" 104†					—	—	—	" 120					<4	<4
Nr. 73†	10^{-2}	4	<4	<4	—	—	—	Nr. 89	10^{-2}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	Nr. 105	10^{-2}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	Nr. 121†	10^{-2}	<4	<4	<4	—	—	—
" 74					<4	<4	<4	" 90†					—	—	—	" 106					<4	<4	<4	" 122					<4	<4
" 75†					—	—	—	" 91					<4	<4	<4	" 107					<4	<4	<4	" 123					<4	<4
" 76					<4	<4	<4	" 92†					—	—	—	" 108					<4	<4	<4	" 124†					—	—
Nr. 77	10^{-3}	<4	<4	<4	4	4	4	Nr. 93	10^{-3}	4	<4	<4	<4	<4	<4	Nr. 109	10^{-3}	<4	<4	<4	<4	<4	<4	Nr. 125†	10^{-3}	<4	<4	<4	—	—	—
" 78					4	4	4	" 94					<4	<4	<4	" 110					<4	<4	<4	" 126					<4	<4
" 79					4	4	4	" 95					<4	<4	<4	" 111					<4	<4	<4	" 127					—	—
" 80					4	4	4	" 96†					—	—	—	" 112†					—	—	—	" 128†					—	—
		Poliomyelitisvirus Typ								Poliomyelitisvirus Typ								Poliomyelitisvirus Typ					

* in der Regel nur bis 1:16 untersucht — Titer wurde nicht bestimmt † Tier während des Versuchs gestorben

Antikörpertiter der Meerschweinchen-Misch- und Einzelseren nach der Wiederholungsimpfung mit dem Poliomyelitis-Impfstoff L

Tabelle 15

Impfstofflagerung bei +4°C					Impfstofflagerung bei +4°C und bei +45°C/1 Std.				Impfstofflagerung bei +20°C/1 Woche				Impfstofflagerung bei +20°C/1 Woche und bei +45°C/1 Std.			
Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Einzelseren *			Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Einzelseren *			Meerschweinchen	Impfstoffverdünnung	Reziproke Titer der Mischseren			Einzelseren *		
		1	2	3	1	2	3			1	2	3	1	2	3			1	2	3	1	2	3
Nr. 129 †	10°	32	32	8	—	—	—	Nr. 145	10°	32	16	128	4	16	4	Nr. 161	10°	64	64	4	> 16	> 16	4
" 130					> 16	> 16	8	" 146 †					—	—	—	" 162 †					—	—	—
" 131					8	8	8	" 147					> 16	> 16	> 16	" 163					> 16	> 16	8
" 132					> 16	> 16	4	" 148					16	8	8	" 164					> 16	> 16	> 16
Nr. 133	10^{-1}	< 4	< 4	< 4	< 4	8	< 4	Nr. 149	10^{-1}	4	4	< 4	< 4	4	< 4	Nr. 165 †	10^{-1}	< 4	4	< 4	—	—	—
" 134					< 4	< 4	< 4	" 150 †					—	—	—	" 166 †					—	—	—
" 135					4	8	< 4	" 151					< 4	< 4	< 4	" 167 †					—	—	—
" 136					< 4	8	< 4	" 152					4	4	4	" 168					—	—	—
Nr. 137 †	10^{-2}	4	< 4	< 4	—	—	—	Nr. 153	10^{-2}	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	Nr. 169 †	10^{-2}	< 4	< 4	< 4	—	—	—
" 138 †					—	—	—	" 154					< 4	< 4	< 4	" 170 †					—	—	—
" 139					< 4	< 4	< 4	" 155					< 4	< 4	< 4	" 171					—	—	—
" 140					< 4	< 4	< 4	" 156					4	< 4	< 4	" 172 †					—	—	—
Nr. 141	10^{-3}	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	Nr. 157	10^{-3}	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	Nr. 173	10^{-3}	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4
" 142					< 4	< 4	< 4	" 158 †					—	—	—	" 174 †					—	—	—
" 143 †					—	—	—	" 159					< 4	< 4	< 4	" 175					< 4	< 4	< 4
" 144 †					—	—	—	" 160					< 4	< 4	< 4	" 176					< 4	< 4	< 4
		Poliomyelitisvirus Typ								Poliomyelitisvirus Typ								Poliomyelitisvirus Typ					

* in der Regel nur bis 1:16 untersucht — Titer wurde nicht bestimmt † Tier während des Versuchs gestorben

Antikörpertiter der Meerschweinchen-Misch- und Einzelseren nach der Wiederholungsimpfung mit dem Poliomyelitis-Impfstoff M

Tabelle 16

Poliomyelitisvirus Typ	Impfstoffverdünnung	Impfstoff K, gelagert bei +4°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+4°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+4°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+4°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+4°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+4°C: d_{50}	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+4°C und +45°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+4°C und +45°C: d_{50}	+20°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+20°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+20°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+20°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+20°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+20°C: d_{50}	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+20°C und +45°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+20°C und +45°C: d_{50}
1	10^{0}	3	1	7	1	87,5	28	2	0	2	0	100	>1<10	†	†	†	†	—	—	1	2	1	2	33,3	—
	10^{-1}	1	2	4	3	57,1		0	1	0	1	0		0	2	0	2	0		0	2	0	4	0	
	10^{-2}	2	2	3	5	37,5		0	1	0	2	0		0	2	0	4	0		0	4	0	8	0	
	10^{-3}	1	3	1	8	11,1		0	1	0	3	0		0	1	0	5	0		0	2	0	10	0	
2	10^{0}	4	0	8	0	100	13	2	0	2	0	100	>1<10						—	3	0	3	0	100	>1<10
	10^{-1}	3	0	4	0	100		0	1	0	1	0		0	2	0	2	0		0	2	0	2	0	
	10^{-2}	1	3	1	3	25		0	1	0	2	0		0	2	0	4	0		0	4	0	6	0	
	10^{-3}	0	4	0	7	0		0	1	0	3	0		0	1	0	5	0		0	2	0	8	0	
3	10^{0}	2	2	4	2	66,6	4,7	1	1	1	1	50	1						—	1	2	1	2	33,3	—
	10^{-1}	2	1	2	3	40		0	1	0	2	0		0	2	0	2	0		0	2	0	4	0	
	10^{-2}	0	4	0	7	0		0	1	0	3	0		0	2	0	4	0		0	4	0	8	0	
	10^{-3}	0	4	0	11	0		0	1	0	4	0		0	1	0	5	0		0	2	0	10	0	

* Antikörpertiter ab 1:4 = positiv

† Tiere während des Versuchs gestorben

Antigenität des Poliomyelitis-Impfstoffes K, angegeben als d_{50}

Tabelle 17

Impfstoff L, gelagert bei

Poliomyelitisvirus Typ	Impfstoffverdünnung	+4°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+4°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+4°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+4°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+4°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+4°C: d_{50}	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+4°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+4°C und +45°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+4°C und +45°C: d_{50}	+20°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+20°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+20°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+20°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+20°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+20°C: d_{50}	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung positiv *	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere pro Verdünnung negativ *	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt positiv *	+20°C und +45°C: Anzahl Tiere insgesamt negativ *	+20°C und +45°C: Tiere (%) mit * positiver Reaktion	+20°C und +45°C: d_{50}
1	10^{0}	4	0	4	0	100		4	0	5	0	100		2	0	2	0	100		0	1	0	1	0	
	10^{-1}	0	2	0	2	0		1	1	1	1	50		0	1	0	1	0		0	3	0	4	0	
	10^{-2}	0	2	0	4	0	>1<10	0	2	0	3	0	10	0	4	0	5	0	>1<10	0	2	0	6	0	—
	10^{-3}	0	4	0	8	0		0	3	0	6	0		0	3	0	8	0		0	2	0	8	0	
2	10^{0}	4	0	6	0	100		4	0	5	0	100		2	0	2	0	100		0	1	0	1	0	
	10^{-1}	2	0	2	0	100		1	1	1	1	50		0	1	0	1	0		0	3	0	4	0	
	10^{-2}	0	2	0	2	0	>10<100	0	2	0	3	0	10	0	4	0	5	0	>1<10	0	2	0	6	0	—
	10^{-3}	0	4	0	6	0		0	3	0	6	0		0	3	0	8	0		0	2	0	8	0	
3	10^{0}	4	0	4	0	100		3	1	3	1	75		1	1	1	1	50		0	1	0	1	0	
	10^{-1}	0	2	0	2	0		0	2	0	3	0		0	1	0	2	0		0	3	0	4	0	
	10^{-2}	0	2	0	4	0	>1<10	0	2	0	5	0	7,5	0	4	0	6	0	1	0	2	0	6	0	—
	10^{-3}	0	4	0	8	0		0	3	0	8	0		0	3	0	9	0		0	2	0	8	0	

* Antikörpertiter ab 1:4 = positiv

Antigenität des Poliomyelitis-Impfstoffes L, angegeben als d_{50}

Tabelle 18

Poliomyelitisvirus Typ	Impfstoffverdünnung	Impfstoff M, gelagert bei +4°C						+4°C und +45°C						+20°C						+20°C und +45°C					
		Anzahl Tiere pro Verdünnung		insgesamt		Tiere (%) mit * positiver Reaktion	d_{50}	Anzahl Tiere pro Verdünnung		insgesamt		Tiere (%) mit * positiver Reaktion	d_{50}	Anzahl Tiere pro Verdünnung		insgesamt		Tiere (%) mit * positiver Reaktion	d_{50}	Anzahl Tiere pro Verdünnung		insgesamt		Tiere (%) mit * positiver Reaktion	d_{50}
		positiv *	negativ	positiv *	negativ			positiv *	negativ	positiv *	negativ			positiv *	negativ	positiv *	negativ			positiv *	negativ	positiv *	negativ		
1	10^{0}	3	0	4	0	100		3	0	5	0	100		3	0	3	0	100		1	1	3	1	75	
	10^{-1}	1	3	1	3	25		1	2	2	2	50		0	1	0	1	0		2	0	2	1	66,6	
	10^{-2}	0	2	0	5	0	1,3	1	3	1	5	16,6	10	0	1	0	2	0	>1<10	0	2	0	3	0	36,1
	10^{-3}	0	2	0	7	0		0	3	0	8	0		0	3	0	5	0		0	1	0	4	0	
2	10^{0}	3	0	6	0	100		3	0	5	0	100		3	0	3	0	100		2	0	4	0	100	
	10^{-1}	3	1	3	1	75		2	1	2	1	66,6		0	1	0	1	0		2	0	2	0	100	
	10^{-2}	0	2	0	3	0	75	0	4	0	5	0	36	0	1	0	2	0	>1<10	0	2	0	2	0	>10<100
	10^{-3}	0	2	0	5	0		0	3	0	8	0		0	3	0	5	0		0	1	0	3	0	
3	10^{0}	3	0	3	0	100		3	0	4	0	100		3	0	3	0	100		2	0	3	0	100	
	10^{-1}	0	4	0	4	0		1	2	1	2	33,3		0	1	0	1	0		1	1	1	1	50	
	10^{-2}	0	2	0	6	0	>1<10	0	4	0	6	0	2,7	0	1	0	2	0	>1<10	0	2	0	3	0	10
	10^{-3}	0	2	0	8	0		0	3	0	9	0		0	3	0	5	0		0	1	0	4	0	

* Antikörpertiter ab 1:4 = positiv

Antigenität des Poliomyelitis-Impfstoffes M, angegeben als d_{50}

Tabelle 19

Ergebnis der Bestimmung des mittleren geometrischen Titers:

Die erhaltenen Werte zeigt die Tabelle 20.

Art der Lagerung *	Impfstoff K			Impfstoff L			Impfstoff M		
4	9,5	13,4	9,5	8	4,8	6,7	4,8	4	2,8
4+	5,7	2,4	2	4	4,8	2,8	4,8	4	5,7
20	Versuchstiere vorzeitig gestorben			2,4	2,8	2,4	4,8	5,7	2,4
20+	2,4	4,8	2	2	2	2	3,4	4	2,8
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	POLIOMYELITISVIRUS TYP								

* 4 = Lagerung bei + 4° C
4+ = " " + 4° C und +45°C/1 Stunde
20 = " " +20° C/1 Woche
20+ = " " +20° C/1 Woche und +45°C/1Stunde

Mittlere geometrische Titer der Mischseren, gewonnen nach der 2. Impfung

Tabelle 20

2) Deshämaggregationsbestimmung

Die aus den erhaltenen Extinktionswerten berechneten Deshämaggregationstiter zeigt die Tabelle 21.

Impfstoff	Art der Lagerung *	Deshämaggregationstiter vor der Behandlung mit RNA se	Deshämaggregationstiter nach der Behandlung mit RNA se
K	4	16 800	15 200
	4+	16 000	17 600
	20	16 000	17 600
	20+	17 600	19 200
L	4	24 000	20 000
	4+	25 600	24 000
	20	20 000	23 700
	20+	20 000	17 600
M	4	22 400	14 400
	4+	19 200	16 800
	20	17 600	17 600
	20+	17 600	16 800

* 4 = Lagerung bei + 4°C
4+ = " " + 4°C und +45°C/1 Stunde
20 = " " +20°C/1 Woche
20+ = " " +20°C/1 Woche und +45°C/1 Stunde

Deshämaggregationstiter der Impfstoffe K, L und M

Tabelle 21

3) Zusammenfassung der Ergebnisse des 3. Versuches

Antigene Wirksamkeit:

Zur Übersicht sind die Ergebnisse der Antigenitätsprüfung (Tab. 14-16) in der Tabelle 22 zusammengefaßt. Dabei wurden

Art der Lagerung \ Impfstoff	K Frischer Impfstoff	L 2 Jahre alter Impfstoff	M 3 Jahre alter Impfstoff
4 gelagert bei +4°C	Alle 3 Typen positiv Typ 2 und 3 auch positiv bei Verd. 1:10	Alle 3 Typen positiv	Alle 3 Typen positiv Typ 2 auch positiv bei Verd. 1:10
4+ gelagert bei +4°C und bei +45°C/1 Std.	Typ 3 negativ Typ 1 und 2 positiv, aber schwächer als bei 4	Alle 3 Typen positiv aber schwächer als bei 4	Alle 3 Typen positiv Typ 2 nicht positiv bei Verd. 1:10
20 gelagert bei +20°C/1 Woche	Ergebnis schlechter als bei 4 (nicht vergleichbar)	Alle 3 Typen positiv aber schwächer als bei 4, 4+	Alle 3 Typen positiv Typ 1 und 2 etwas stärker als bei 4+
20+ gelagert bei +20°C/1 Woche und bei +45°C/1 Std.	Typ 1 und 3 negativ Typ 2 positiv, aber schwächer als bei 4, 4+	Alle 3 Typen negativ	Typ 1 und 3 negativ Typ 2 positiv, aber schwächer als bei 4, 4+, 20

Antigene Wirksamkeit der Poliomyelitis-Impfstoffe K, L und M

Zusammenfassung der Tabellen 14 - 16

Titer ab 1:8 = positiv

Tabelle 22

Einzel- bzw. Mischseren mit einem Titer von 1:8 und größer als positiv gewertet.

1) Während der Impfstoff L nach einer 1 wöchigen Lagerung bei +20°C in seiner antigenen Wirksamkeit starker geschädigt ist als nach einer 1 stündigen Lagerung bei +45°C, hat der Impfstoff M durch die 1 stündige Belastung bei +45°C stärker gelitten.

2) Das Poliomyelitis-Virus Typ 3 übersteht die Belastungen am schlechtesten. Typ 2 erweist sich am stabilsten. Denn nach der stärksten Belastung (1 Stunde bei +45°C nach einer 1 wöchigen Lagerung bei +20°C) zeigen die Impfstoffe K und M nur für den Typ 2 antigene Wirksamkeit.

3) Ein Abfall nach der Belastung ist am deutlichsten beim "frischen" Impfstoff K ausgeprägt. Bei den "älteren" Impfstoffen L und M scheint die Antigenität schon durch das Lagern bei +4°C gelitten zu haben. Jedoch erwies sich diese Restantigenität - vielleicht als Folge einer Abnahme thermolabiler Teilchen - im Versuch den Belastungen gegenüber widerstandsfähiger als die Antigenität des "frischen" Impfstoffes K.

Deshämaggregationsvermögen:

Vergleicht man die Deshämaggregationstiter, die vor der Behandlung mit Nukleasen erhalten wurden, so kann folgendes festgestellt werden:

1) Der "frische" Impfstoff K zeigt die niedrigsten Titer.

2) Die Titer des Impfstoffes K blieben trotz der Temperaturbelastungen nahezu unverändert.

3) Bei den "älteren" Impfstoffen L und M nimmt das Deshämaggregationsvermögen ab. Unterschiedlich reagieren sie auf die 1-stündige Temperaturbelastung bei +45°C: Nur der Titer des Impfstoffes M fällt ab. Am stärksten ist der Titerabfall nach einer 1-wöchigen Lagerung bei +20°C. Er wird durch die anschließende 1-stündige Belastung bei +45°C nicht mehr übertroffen.

Die Frage, ob möglicherweise aus den Viren freigesetzte Nukleinsäure bei den "älteren" Impfstoffen L und M den Deshämaggregationstiter erhöht hat, muß nach der Behandlung der Impfstoffe mit Nukleasen und einer erneuten Titerbestimmung verneint werden.

Beziehung zwischen antigener Wirksamkeit und Deshämaggregationsvermögen:

Betrachtet man die Deshämaggregationstiter im Zusammenhang

mit den Antikörpertitern, fällt folgendes auf:

1) Die Höhe des Deshämaggregationstiters sagt nichts über die Antigenität eines Impfstoffes aus. Die höheren Werte zeigen die antigen schwächeren Impfstoffe L und M.

2) Wird ein Impfstoff höheren Temperaturen ausgesetzt und bestimmt man vor und nach der Temperaturbelastung seinen Deshämaggregationstiter, darf man aus einem unveränderten Titer nicht auf unveränderte Antigenität schließen. Ist allerdings der Titer abgefallen, spricht dies für eine gleichzeitige Schädigung der Antigenität. Über das Ausmaß dieser Schädigung kann nur der Tierversuch Auskunft geben.

Die anfangs gestellte Frage, ob die Unterwertigkeit eines Impfstoffes zu beschreiben sei, läßt sich auf Grund des Deshämaggregationsergebnisses des 3. Versuches bejahen. Die beiden "älteren" Impfstoffe L und M reagieren im Gegensatz zum "frischen" Impfstoff K auf die Temperaturbelastungen mit einem Abfall des Deshämaggregationstiters. Es bietet sich daher die Möglichkeit, ältere von frischen Impfstoffen nach Temperaturbelastungen mit Hilfe des Deshämaggregationstestes zu unterscheiden. Er vermag aber den Neutralisationstest nicht zu ersetzen, der allein genaue Angaben über die antigene Wirksamkeit eines Impfstoffes liefert.

D Zusammenfassung und Diskussion

Der Begriff der "Haltbarkeit" eines Impfstoffes ist sehr komplex. Jede Impfstoffart, jedes verwendete Antigen reagiert individuell, möglicherweise sogar nach Chargen unterschiedlich, auf Belastungen durch ungünstige Lagerungstemperaturen.

Auch ist die Ursache einer verminderten Haltbarkeit schwer erkennbar. Daher sollte versucht werden, mit chemischen und physikalischen Methoden Veränderungen im Impfstoff zu erfassen. Es schien möglich, daß z.B. lytische Prozesse ablaufen, die bei Abnahme intakter Virusteilchen zu einer Zunahme von Proteinbruchstücken oder Aminosäuren und freier Nukleinsäure führen.

Der Versuch in der Dünnschichtchromatographie zeigte jedoch, daß sich mit dieser Methode eine Änderung der Aminosäurenzusammensetzung nicht nachweisen läßt.

Auch der Nachweis frei gewordener Nukleinsäure ist aus folgenden Gründen - selbst wenn sämtliche Viren in Protein und Nukleinsäuren zerfielen - mit den herkömmlichen Methoden nicht möglich.

Nukleinsäuren bestehen aus langen Ketten, deren einzelne Glieder aus den Nukleotiden gebildet werden. Die Nukleotide setzen sich aus einem Basen-, einem Zucker- und einem Phosphatanteil zusammen. Bei den verschiedenen Bestimmungsmethoden wird entweder die Menge des Basen-, des Zucker- oder des Phosphatanteils bestimmt. Meistens handelt es sich um Farbreaktionen, bei denen aus der entstandenen Farbintensität auf die Menge des entsprechenden Anteils und dadurch auf die Nukleinsäuremenge geschlossen wird. Daneben wird auch die UV-Messung benutzt, wobei aus der maximalen und minimalen Absorption bei bestimmten Wellenlängen die vorhandene Nukleinsäuremenge oder die ihrer Basenanteile bestimmt werden kann. Dies ist zur Zeit die zuverlässigste Methode (74). Allerdings muß die Anwesenheit niederer Spaltprodukte ausgeschlossen sein. Diese Methoden lassen sich leider nicht unbegrenzt anwenden, sondern erfordern eine bestimmte Mindestmenge an Nukleinsäure oder ihren Bausteinen. So werden für den Nachweis des Phosphat- oder

Zuckeranteils ca. 10^{-3} bis 10^{-2} mg Ribonukleinsäure benotigt, für die entsprechende Basenbestimmung $5 \cdot 10^{-3}$ bis 10^{-2} mg Ribonukleinsäure. Nach Uecker (75) sind im Poliomyelitis-Impfstoff maximal ca. 10^{7} infektiöse Viruseinheiten pro Milliliter zu je ca. 30 Virusteilchen enthalten. Da nach Taylor (76) ein Virusteilchen ca. $2\text{-}3 \cdot 10^{-14}$ mg Protein besitzt, bedeutet dies ca. $6\text{-}9 \cdot 10^{-6}$ mg Virusprotein/ml. Da das Poliomyelitis-Virus ca. 27% Ribonukleinsäure enthält (77), ergibt dies $1{,}6\text{-}2{,}4 \cdot 10^{-6}$ mg RNS/ml. Daraus folgt, daß bei einem Zerfall selbst sämtlicher Impfstoffviren die frei werdende Nukleinsäure mit den genannten Methoden nicht nachzuweisen ist, da die Differenz zwischen der tatsächlichen und der zum Nachweis notwendigen Menge 3-4 Zehnerpotenzen beträgt.

Zwar hat Drescher eine Deshämaggregationsmethode ausgearbeitet, mit der bis zu 1/1000γNukleinsäure/ml zu bestimmen ist, doch auch mit dieser Methode ließ sich keine freie Nukleinsäure nachweisen (siehe Ergebnis des Deshämaggregationsversuches nach der vorangegangenen Behandlung der Impfstoffe mit Nukleasen).

Auch eine p_H-Wert-Verschiebung könnte auf eine Änderung der Impfstoffzusammensetzung zurückzuführen sein. Andererseits bedeutet der Nachweis eines unveränderten p_H-Wertes nicht, daß der Impfstoff stabil geblieben ist, wie es auch das Ergebnis der Experimente zeigte.

Daraus wurde gefolgert, daß es zur Zeit mit chemischen und physikalischen Methoden nicht möglich ist, die Haltbarkeit betr. den Abfall der Wertigkeit eines Impfstoffes auf Grund von Veränderungen in seiner Zusammensetzung zu beurteilen.

Daher wurde die Haltbarkeit der Impfstoffe durch Wirksamkeitsprüfungen bestimmt, und zwar durch sogenannte "in vivo"-Teste: Der Gelbfieber-Impfstoff in Bezug auf seine Infektiosität an der weißen Maus, der Poliomyelitis-Impfstoff in Bezug auf seine Antigenität am Meerschweinchen.

Die Haltbarkeit des Gelbfieber-Impfstoffes wurde geprüft, indem Impfstoffampullen offen in der Tiefkühltruhe bei einer relativen Luftfeuchtigkeit bis zu 75% gelagert wurden. Im Vergleich zu vorschriftsmäßig gelagerten Kontrollen einerseits

und bei +40°C gelagerten Ampullen andererseits konnte im Infektionsversuch an der weißen Maus gezeigt werden, daß der Titer des offen gelagerten Impfstoffes nur ca. 28% niedriger war als der des vorschriftsmäßig gelagerten.

Beim Poliomyelitis-Impfstoff sollte festgestellt werden, wie weit sich Belastungen durch unterschiedliche Temperaturen auf die Haltbarkeit auswirken und ob damit eine Methode gegeben ist, z.B. eine Unterwertigkeit des Impfstoffes zu beschreiben. Es wurde die Antigenität verschieden lang gelagerter Impfstoffe nach unterschiedlich starker Temperaturbelastung am Meerschweinchen bestimmt. Es ergab sich, daß das Poliomyelitisvirus Typ 2 die Temperaturbelastungen am besten überstand und daß der Titerabfall nach der Belastung beim frischen Impfstoff K am deutlichsten ausgepragt war.

Neben den aufwendigen "in vivo"-Testen gibt es eine Reihe von "in vitro"-Prüfungen wie z.B. Keimzahl- und Lf-Wert-Bestimmungen oder die von Fulthorpe (78) für den Tetanus-Impfstoff empfohlene Hämagglutinationshemmreaktion. Auch der von Drescher und Schrader ausgearbeitete Deshämaggregationstest gehört zu diesen "in vitro"-Prüfungen. Diese Methode wurde beim Poliomyelitis-Impfstoff parallel zur Antigenitätsbestimmung angewandt. Es zeigte sich, daß es möglich ist, mit Hilfe des Deshämaggregationstestes einen frischen Impfstoff von älteren zu unterscheiden: Nicht durch die absolute Titerhöhe, sondern durch den trotz Temperaturbelastung stabil bleibenden Titer.

Über die antigene Wirksamkeit des Impfstoffes kann nur der Tierversuch genaue Angaben liefern; insbesondere darüber, ob ein älterer Impfstoff über eine für eine erfolgreiche Immunisierung ausreichende Antigenität verfügt. Auch Regamey (37), van Ramshorst (36), Ehrengut (36), Bonin (65) und Günther (83) halten den Tierversuch zur Bestimmung des Immunisierungsvermögens eines Impfstoffes für zuverlässiger, abgesehen davon, daß sich nach Wiesener (79) z.B. der Lf-Wert am fertigen Adsorbat-Impfstoff nicht bestimmen läßt. Allerdings ist stets zu bedenken, daß die Wirksamkeit von Impfstoffen bei Mensch und Tier nicht gleich sein muß, wenn auch eine Paral-

lele zwischen dem festgestellten Wert eines Impfstoffes (Vergleich mit einem Standard) und dessen Wirksamkeit am Menschen angenommen werden kann (36,65).

E Schluß

Flüssige Impfstoffe - unter der Voraussetzung einer nahezu optimalen Zusammensetzung - sind nach dem Verlassen des Herstellerwerkes am meisten durch höhere Temperaturen in ihrer Haltbarkeit gefährdet.

Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, nur gefriergetrocknete Produkte herzustellen und zu versenden. Zwar ist auch bei ihnen ein für die Haltbarkeit mindernder Temperatureinfluß vorhanden, aber dieser Einfluß ist bedeutend geringer als bei den entsprechenden flüssigen Impfstoffen (Tab. 5).

Gerade beim BCG-Impfstoff hat sich die Einführung der Gefriertrocknung sehr vorteilhaft ausgewirkt: Der flüssige BCG-Impfstoff war bei +4°C nur 14 Tage lang haltbar (42), ein Zeitraum, in dem nicht einmal die Wirksamkeit zu überprüfen war.

Leider ist es heutzutage noch nicht möglich oder zu unwirtschaftlich, sämtliche Impfstoffe in gefriergetrockneter Form herzustellen.

So läßt sich im Gegensatz zu den lipoidhaltigen Viren - wie die Influenza-Viren - das Poliomyelitis-Virus bis jetzt noch nicht mit Erfolg lyophilisieren (z.B. George und Gharpure (80)). Bei Versuchen von Nagel (81) und Hekker (82) mit Poliomyelitis-Impfstoffen aus inaktivierten Viren zeigte sich, daß die gefriergetrockneten Impfstoffe bei der anschließenden Lagerung bei höheren Temperaturen zwar wirksamer waren als die flüssigen, daß der erzielte Antikörpergehalt im Kücken aber beträchtlich unter dem Wert lag, der mit dem bei +4°C gelagerten flüssigen Impfstoff erreicht wurde.

Solange daher flüssige Impfstoffe verwendet werden, ist dafür zu sorgen, daß sie nicht längere Zeit z.B. statt Temperaturen unter +10°C Temperaturen über +20°C ausgesetzt sind. Bedauerlicherweise ist aus eigener Erfahrung als Apotheker bekannt, daß ein Impfstoff zwischen seiner Ankunft in der Apotheke und seiner Aufbewahrung an kühlem Ort - nicht einmal immer im Kühlschrank - längere Zeit höheren Temperaturen ausgesetzt sein kann. Außerdem ist zu bedenken, daß ein Impfstoff bei

seiner Lieferung in die Apotheke und auch auf dem Wege über den Patienten zum Arzt durch seine Wärmeempfindlichkeit an Wirksamkeit verlieren kann. Aus diesen Gründen ist zu fordern, zumindest Impfstoffe, die unterhalb von +20°C aufzubewahren sind, zum Schutze ihrer Haltbarkeit nur innerhalb einer Kühlkette zu transportieren.

F Literaturangaben

1) Arzneimittelgesetz v. 16.5.1961, BGBl.I S.533
2) Hennessen/Mauler, Hypersensitisation by Measles Virus, Lancet I,902, 1967
3) Henneberg, Poliomyelitis-Schutzimpfg. mit Lebendimpfstoff (Cox) in Berlin im Mai 1960, Bundesgesundheitsbl.5,153,1962
4) Drescher, persönl. Mitteilung
5) Schindler in "Spiess, Schutzimpfungen, G. Thieme Vlg., Sttgt., 1966"
6) Ebina et al., in "Haefliger, Bedeutg.u.Stand d.BCG-Schutzimpfg. gegen Tuberkulose, Sprg. Vlg., Berlin , 1966"
7) Morgan,Morton,Parker, Nutrition of Animals Cells in Tissue Culture. I. Initial Studies on a Synthetic Medium, Proc.Soc.Exp.Biol. Med.73,1,1950
8) VO z.Ausführung d.Reichsimpfgesetzes v.22.1.1940 Verwaltungsvorschr.d.Bundesländer als Ersatz für d.RdErl. d.RMdI v.19.4.1940
9) Dostal, Advances in the Production of Smallpox Vaccine, Progr.in Med.Virology 4,259,1962
10) Hansen in "Spiess,Schutzimpfungen,G.Thieme Vlg.,Sttgt., 1966"
11) Hahn et al., Attività protettrice dell'idrossido di alluminio sul potere antigenico di vaccini antipoliomielitici tipo Salk, Boll.Ist.Sierot.Milan.42,369,1963
12) Kunert/Wolff, Untersuchungen über d.Virulenz-Abschwächung v.Pockenschutzimpfstoffen durch Aureomycin, Arch.Hyg.147,532,1963
13) Pivnick et al., Studies of Preservatives of Poliomyelitis (Salk) Vaccine, J.Pharm.Sc.52-9,883, 1963
14) Arro, The Use of Quaternary Ammonium Compounds as Preservatives in Poliovirus Vaccine, Acta Path.Mikrobiol.Scand.61,106,1964

15) Olson et al., Stabilization of Pertussis Vaccine in the Presence of Benzethonium Chloride, J.Bact.87,543,1964

16) Pontecorvo, Problems Involved in Combining Pertussis with Killed Viral Vaccines, Riv.Ist.Sierot. Ital.42,121,1967

17) Wallhäußer/Schmidt, Sterilisation,Desinfektion,Konservierung,Chemotherapie, G.Thieme Vlg., Sttgt., 1967

18) Impfstoffe d.Behringwerke:
a) TAB-Impfst.
b) Pertussis-Impfst.
c) Tetanus-Impfst.
d) Diph.-Per.-Tet.-Impfst.
e) Diph.-Tet.-Impfst.
f) Influenza-Impfst.
g) Cholera-Impfst.
h) Tollwut-Impfst.n.Hempt-Nikolitsch
i) Tollwut-Impfst.n.Hempt
k) BCG-Impfst.,flüssig
l) BCG-Trocken-Impfst.
m) Masern-Impfst.,vermehrungsf. Viren
o) Diphtherie-Impfst.

19) Davisson et al., The Preservation of Poliomyelitis Vaccine with Stabilized Merthiolate,J.Lab.Clin. Med.47,8,1956

20) Mohr in "Spiess,Schutzimpfungen,G.Thieme Vlg., Sttgt., 1966"

21) Influenza-Impfstoff der Asta-Werke

22) Banič, Über schädl.Wirkung d. Phenols auf d.antirab. Vakzine, Zschr.Immun.Forsch.110,502, 1953

23) Dostal/Lorenz in "Spiess, Schutzimpfungen,G.Thieme Vlg., Sttgt., 1966"

24) Potel/Hlawatsch, Untersuchungen über d.Influenza-Virus und Influenza-Impfstoffe, Zschr. Immun.Forsch.122,58,1961

25) Huet/Deinse, Freeze Dried BCG-Vaccine, Fortschr.Tuberk. Forsch.8,31,1957

26) Collier, The Development of a Stable Smallpox Vaccine, J.Hyg.53, 76, 1955

27) Rosenthal, The Preservation of BCG by Freeze Drying, Acta Tuberk.Scand.26,106,1952

28) Beale/Ungar, Lancet II,805,1962
zitiert bei Hennessen in "Herrlich, Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg.Vlg.,1965"

29) Evangelinos/Wohlfeil, Über Bakterienautolyse und deren Bedeutung für bakt.Impfstoffe, Zentralbl.Bakt.I, Orig.144,129,1939

30) Bonin et al., The Stability of the Typ 1 Component of Trivalent Oral Poliovirus Vaccines, Symp.f.Komb.-Impfstoffe, Marburg/Lahn, 29.-31.3.1967

31) Weihl et al., Purified Poliomyelitis Vaccine, JAMA 176, 409,1961

32) Munz in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg.Vlg.,1965"

33) Birner/Garnet, Factors Affecting the Concentration of Thimerosal in Aqueous Solutions and in Vaccines Stored in Rubber-Capped Bottles, J.Pharm.Sc.53,1424,1964

34) Joó, Significance of Bacterial Count in the Preparation and Potency Test of Vaccines, Proc.6. Internat.Congr.Microbiol.Stand. Wiesbaden, 245,1960
zitiert bei Günther in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg.Vlg.,1965"

35) Schäfer in "Spiess,Schutzimpfungen,G.Thieme Vlg.,Sttgt., 1966"

36) van Ramshorst/Ehrengut in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn., Sprg.Vlg.,1965"

37) Regamey in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg.Vlg., 1965"

38) Gildemeister in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg. Vlg.,1965"

39) Spiess/Enders-Ruckle in "Spiess,Schutzimpfungen, G.Thieme Vlg., Sttgt.,1966"

40) Vivell in "Spiess,Schutzimpfungen,G.Thieme Vlg.,Sttgt, 1966"

41) Hennessen/Körner, Über die Wirksamkeit und Stabilität von inaktivierten Poliovirusantigenen in $Al(OH)_3$-haltigen Impfstoffen, Zschr. Hyg.149,359,1964

42) Spiess in "Spiess,Schutzimpfungen,G.Thieme Vlg.,Sttgt., 1966"

43) Rosenthal, Modified Methods of Culturing and Preparation of BCG Vaccine, Fortschr.Tuberk.Forsch. 8,48,1957

44) Fisek, Kinetics of Detoriation of Smallpox Vaccine, Bull. WHO 22,435,1960
zitiert bei Munz in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn., Sprg.Vlg.,1965"

45) Posch, Pockenbekämpfung auf Landesebene am Bsp.v. Nordrhein-Westfalen, Abh.aus Bund. Gesundh.Amt, Heft 7,77,1963

46) Hahn/Giacometti, Stability of Oral Polio Vaccine, Boll.Ist.Sieroter.45,438,1966

47) Melnick/Wallis, Effect of pH on Thermal Stabilization of Oral Poliovirus Vaccine by Magnesium Chloride, Proc.Soc.Exp.Biol.Med.112, 894,1963

48) Melnick et al., Immunogenic Potency of $MgCl_2$-Stabilized Oral Poliovaccine, JAMA 185, 406, 1963

49) Perkins/Yetts, Stability of the Potency of Poliomyelitis Vaccine, Brit.Med.J.31,1959-1

50) de Somer et al., A Four Point Assay for Testing Poliovaccine, Arch.Vir.Forsch.8,430,1958

51) Powell/Culbertson, Short Term Heat Stability of Poliomyelitis Vaccine, Proc.Soc.Exp.Biol.Med.89,490, 1955

52) Rosenthal, BCG-Vaccination against Tbc, London,Churchill, 1957

53) Murray, The Preparation of a Stable Potent Dried Smallpox Vaccine, Symp.Internat.sur la Vaccinat. Antivariol., ed.Inst.Merieux,Lyon 1962; zitiert bei Munz in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg.Vlg.,1965"

54) Voß, Die moderne Entwicklung der Gefriertrocknung, Bundesgesundheitsbl.3,177,1960

55) Ebina/Kayaba in "Haefliger,Bedeutg.u.Stand d.BCG-Schutzimpfg. gegen Tuberkulose, Sprg.Vlg., Berlin,1966"

56) Eissner, Zehn Jahre staatliche BCG-Kontrolle, Deutsche Med.Wo-schr.,1821,1954

57a) Staatl.Prüfg.v.Impfstoffen gegen Kinderlähmung, Hess. Staatsanz. 22.10.1963

b) Vorläufige Vorschriften f.d.staatl.Prüfg.von oral anzuwendenden Impfstoffen gegen Kinderlähmung aus vermehrungsf., abgeschwächt. Virus, Hess.Staatsanz.22.10.1963

58) Anweisung f.Gelbfieber-Vakz.aus Amsterd.Tropeninst.

59) Deutsches Arzneibuch 7.Ausgabe 1968

60) RdErl.d.Min.f.Volkswohlf.u.d.Min.f.Landw.Dom.Forst. v.15.7.1929 über "Impfstoffe und Sera"

61) Penna, Production of 17 D Yellow Fever Vaccine, WHO Monogr.Ser.30,67,1956

62) WHO Techn.Rep.Ser.179,1959 Requirements for Yellow Fever Vaccine

63) Behring Codex,Sttgt.,1964

64) Prigge, Wirksamkeit u.Schutzkraft d.Diphtherie-Impfstoffe, Behringwerke-Mitteilungen 21,75,1942

65) Bonin in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg.Vlg., 1965"

66) Hirst, The Agglutination of Red Cell by Allantoic Fluid of Chick Embryo Infected with Influenza Virus, Science 94,22,1941

67) Drescher/Schrader, Titration of Poliovirus and Influenzavirus by Means of the Hemaggregation Test, Americ.J.Hyg.79,218,1964

68) Burrus/Hargett, Yellow Fever Vaccine Inactivation Studies, Publ.Health Rep.62,940,1947

69) Hahn/Bugher, The Stability of Chick Embryo Yellow Fever Vaccine during Storage, J.Immun.70, 352,1953

70) Reed/Muench, A Simple Method of Estimating Fifty per Cent Endpoints, Americ.J.Hyg.27,493, 1938

71) Grafe/Kuhn, Die Potenzierung v.Impfstoffen durch Al_2O_3-Adsorption, Arzneimittelforsch.12,33,1962

72) Grützner in "Henneberg/Köhler, Praktik.d.Virus-Diagn., Fischer Vlg., 1961"

73) Drescher, in Druck
74) Fischer/Dörfel in "Hoppe-Seyler-Thierfelder IV,2,Sprg.Vlg., 1960"
75) Uecker, Der Einfluß v.Aggregation und Filtration auf d. Inaktivierung v.Viren, Abh.aus d.Bund. Gesundh.Amt, Heft 3,63,1959
76) Taylor, zit.bei 75)
77) Schaffer/Schwerdt, Purification and Properties of Poliovirus, Adv.in Vir.Res.VI,159,1959
78) Fulthorpe, Tetanus Antitoxin Titration by Haemagglutination at a Low Level of Test, J.Hyg.56, 183,1958
79) Wiesener in "Spiess,Schutzimpfgn., G.Thieme Vlg.,Sttgt., 1958"
80) George/Gharpure, Lyophilization of Enteroviruses, Ind.J.Path.Bact.46,1964
81) Nagel et al., Some Experiments on Freezedrying of Inactivated Poliomyelitis-Vaccine, Arch. Vir.Forsch.12,718,1963
82) Hekker et al., Freeze-Drying of Inactivated Poliomyelitis-virus Vaccine, 9.Europ.Symp.über Poliom.u.verwandte Krankhtn., Stockholm, 1.-4.Sept.1963
83) Günther in "Herrlich,Hdbuch d.Schutzimpfgn.,Sprg.Vlg., 1965"
84) Logarithm.Rechentafeln, Küster/Thiel/Fischbeck,W.d.Gruyter Vlg.,Berlin,1958
85) Fisher/Yates, Statist.Tables f.Biol.,Agricult.,Med.Res., Oliver/Boyd,London,1957

Lebenslauf

Am 19.Dezember 1935 wurde ich als Sohn des Bankangestellten Kurt Romberg und seiner Ehefrau Hanna, geb. Döppner, in Schwerin (Meckl.) geboren. Ich besuchte dort von 1942 bis 1947 - mit ca. einjähriger Unterbrechung zum Kriegsende - die Grundschule und ab September 1947 das Berliner Goethe-Gymnasium, an dem ich im Frühjahr 1956 die Reifeprüfung bestand.

Vom 1.April 1956 bis 31.März 1958 war ich Praktikant in der Berliner Reichs-Apotheke bei Herrn Dr. Bertram. Am 28.März 1958 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung. Mein Pharmaziestudium betrieb ich an der Freien Universität Berlin ab Sommer 1958. Nach 6 Semestern konnte ich es am 24.April 1961 mit der Pharmazeutischen Prüfung erfolgreich beenden. Als Kandidat der Pharmazie arbeitete ich in Hildesheim in der Marien-Apotheke bei Herrn Büsse. Im August 1962 erhielt ich meine Bestallung als Apotheker. Im Oktober 1962 kehrte ich nach Berlin zurück und arbeitete seitdem in verschiedenen öffentlichen Apotheken. Anfang 1963 erhielt ich von Herrn Professor Dr.G.Henneberg das Thema meiner Arbeit. Zum Wintersemester 1963/64 nahm ich mein Studium wieder auf.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Clemens, Drawert, Eckardt, Frömming, Gillert, Hänsel, Henneberg, Jahr, Koransky, Lassen, Lautsch, Loth, Rommeney, Schenck, Schmidt, Schütte, Vidic, Wojahn und die Herren Dr. von Oldershausen, Dr. Parthey und Dr. Seelert.

difo-druck schmacht · bamberg